

Bruno Sacconi Canaver

Avaliação do uso de quitosana e de fumigação para o controle de podridões em frutos da macieira (*Malus domestica* Borkh.) causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia Agroflorestal, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Robson M. Di Piero, Dr.

**Florianópolis
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C212a Canaver, Bruno Sacconi

Avaliação do uso de quitosana e de fumigação para o controle de podridões em frutos da macieira (*Malus domestica* Borkh.) causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* [dissertação] / Bruno Sacconi Canaver ; orientador, Robson Marcelo Di Piero. - Florianópolis, SC, 2010.
xxviii, 122 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Quitosana. 3. Fumigação. 4. *Penicillium*. 5. *Botrytis cinerea*. I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

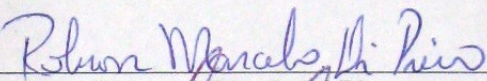
“Avaliação do uso de quitosana e de fumigação para o controle de podridões em frutos da macieira (*Malus domestica* Borkh) causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*.”

POR

Bruno Sacconi Canaver

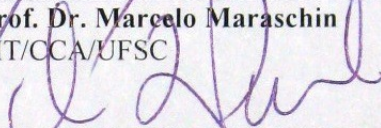
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

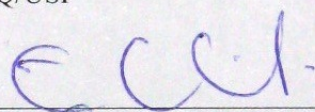
Orientador:

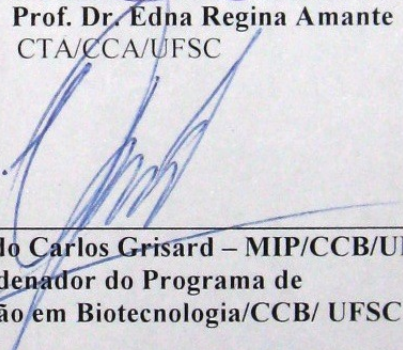

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
FIT/CCA/UFSC

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Maraschin
FIT/CCA/UFSC


Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati
ESALQ/USP


Prof. Dr. Edna Regina Amante
CTA/CCA/UFSC


Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/ UFSC

Florianópolis, Novembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, possibilitando mais uma vitória e sempre me guiando pelos melhores caminhos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Professor Dr. Robson Marcelo Di Piero pela oportunidade, sugestões, orientações, paciência e, acima de tudo, pela compreensão ao longo desses anos que caminhamos juntos.

Ao Professor Dr. Marcelo Maraschin do Departamento de Fitotecnia pela atenção, pelos ensinamentos e sugestões dadas durante a realização dos experimentos.

À Professora Dra. Edna Regina Amante do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por ceder o espaço na câmara refrigerada.

Ao Técnico - Administrativo Luiz Carlos da Silva do Laboratório de Sementes por ceder o espaço do laboratório para condução dos experimentos.

Aos meus pais, Luis Antonio Canaver e Ligia Sacconi Canaver, pelo amor, carinho, incentivo e aporte financeiro durante minha formação.

À Cooperativa Regional Agropecuária Serrana (Cooperserra) e a Empresa AD Oceanum Indústria e Comércio Ltda. pelo fornecimento, respectivamente, dos frutos da macieira cv. Fuji e da quitosana utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

Aos Eng. Agrônomos José Itamar Bonetti e Yoshinori Katsurayama da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina pela atenção e disponibilidade.

À minha namorada Clarissa pelo carinho, dedicação, incentivo e paciência.

Aos meus amigos Leonardo, Mateus, Valdenir, Zamira, Diego, Maíra, Amanda, Danila, Ricardo, pelos momentos agradáveis que passamos juntos no dia-a-dia do LabFitop.

A tantas outras pessoas que, de forma direta e indireta, contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Biografia do autor

Bruno Sacconi Canaver, filho de Luis Antonio Canaver e Ligia Sacconi Canaver, nasceu em 21 de dezembro de 1983, no estado de São Paulo.

Paulistano nato, cresceu no bairro Jd. Patente e cursou o ensino fundamental no colégio jesuíta São Francisco Xavier, localizado no bairro Ipiranga, zona sul.

No ensino médio, foi transferido para o Colégio Etapa, localizado no bairro da Consolação, onde concluiu o ensino médio no ano de 2001, prestando vestibular nesse mesmo ano.

Passou em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa e na Universidade Federal de Santa Catarina, ingressando na UFSC no ano de 2002.

No ano de 2004, o acadêmico de Agronomia ingressou no Núcleo Pastoreio Racional Voisin, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho, do Laboratório de Etologia Aplicada do Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural, como bolsista do Programa de Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina no Projeto intitulado “Produção Agroecológica de Leite em Pastoreio Racional Voisin em Municípios do Oeste Catarinense”.

Em 2006, assumiu a monitoria da disciplina curricular FIT5607 Fitopatologia, ministrada para o curso de graduação em Agronomia da UFSC.

Ainda no ano de 2006, o até então acadêmico de Agronomia foi aprovado no concurso público (Edital 05/2006) para o cargo de Assistente Agropecuário I, na função de Engenheiro Agrônomo da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, não podendo assumir o cargo, pois não havia recebido a titulação do ensino superior.

No ano de 2007, o acadêmico defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso, sob a orientação do Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero, intitulado “Avaliação do efeito da pulverização de quitosana em macieiras no controle de podridões em pós-colheita”.

Em 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em nível de mestrado, sob a orientação do Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero.

No ano de 2010, foi nomeado pelo decreto nº 6.940 para o cargo Agente Profissional da Secretária de Estado da Administração e da

Previdência do Estado do Paraná na função de Engenheiro Agrônomo (Diário Oficial do Paraná nº 8.214 de 05 de maio de 2010). Atuante na Divisão de Fiscalização de Insumos e Serviços Agrícolas do Departamento de Fiscalização da SEAB.

RESUMO

CANAVER, B.S. **Avaliação do uso de quitosana e de fumigação para o controle de podridões em frutos da macieira (*Malus domestica* Borkh.) causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*.** Florianópolis, 2010. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina]

Perdas substanciais de produção são registradas em pós-colheita de macieira causadas principalmente pelos fungos *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. Os métodos usuais de controle envolvem a imersão de frutos em soluções fungicidas e o uso da refrigeração. Na busca por métodos alternativos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da quitosana e do vapor de ácidos de cadeia curta, *in vivo* e *in vitro*, sobre os fungos *P. expansum* e *B. cinerea*. Nos ensaios *in vivo*, os frutos de macieira foram inoculados com uma suspensão de esporos de *P. expansum* ou *B. cinerea* antes (efeito curativo) ou após (efeito preventivo) a imersão em suspensão de quitosana ou nas suas formulações. Os frutos tratados foram armazenados, no escuro, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob alta umidade relativa, e avaliados periodicamente quanto à incidência e à severidade das podridões. Nos ensaios *in vitro*, avaliou-se o efeito de quitosana sobre a formação de colônias de *P. expansum*, o crescimento micelial e a esporulação de *B. cinerea*, bem como a germinação de esporos e o comprimento do tubo germinativo de ambos. Os resultados indicaram que a imersão dos frutos de macieira em suspensões de quitosana a 0,25 e 0,5% reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em até 54 e 74% em tratamentos preventivos, respectivamente. Nos tratamentos curativos, adjuvantes foram necessários para se obter bons níveis de redução da severidade das podridões: a adição de glicerol a 3,0% na suspensão de quitosana a 0,5% reduziu em 47,6% a severidade da podridão de *Penicillium*; a formulação contendo quitosana a 0,25%, glicerol a 0,75%, estearato de magnésio a 0,1% e Tween 80 a 0,1% foi eficiente em reduzir as podridões de *P. expansum* e *B. cinerea* em 26,5 e 44,6%, respectivamente. Por outro lado, a adição de cloreto de cálcio ou carbonato de potássio às suspensões de quitosana não aumentou a eficiência de controle das suspensões contra as podridões. *In vitro*, a quitosana a 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu significativamente a germinação de esporos e a elongação do tubo germinativo de *P. expansum* e *B. cinerea*, respectivamente. Comparando-se diferentes quitosanas, a de baixo peso molecular (Qbpm) e a comercial (Qcom) reduziram o crescimento micelial

e estimularam a esporulação de *B. cinerea* em meio BDA. A atividade de peroxidases em tecidos de maçã inoculados com *P. expansum* foi maior do que nos tecidos não inoculados. No entanto, não houve efeito da quitosana sobre a atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas em frutos tratados. Na segunda etapa do trabalho, testou-se a fumigação dos frutos de macieira cv. Fuji com os ácidos fórmico, acético e propanóico, bem como etanol e hexanal. Para tanto, depositou-se uma suspensão de esporos de *P. expansum* na epiderme intacta dos frutos. Após a secagem, os frutos foram fumigados por 30 min e, posteriormente, feridos no local da deposição dos esporos. Avaliou-se a severidade e a incidência da podridão. A fumigação dos frutos de macieira cv. Fuji, contendo esporos de *P. expansum* em sua epiderme, com os ácidos fórmico, acético e propanóico foi eficiente em reduzir a severidade e a incidência da podridão de *Penicillium*. Os ácidos ainda inibiram totalmente a germinação do fungo em lâminas escavadas, quando utilizados a $12 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar, mostrando potencial para reduzir a concentração inicial de inóculo que se encontra tanto na epiderme dos frutos como nas embalagens de acondicionamento. Dessa forma, os resultados do trabalho indicaram que as reduções na severidade das podridões pela imersão dos frutos de macieira em quitosana e suas formulações devem-se principalmente à atividade antibiótica da quitosana. O uso da fumigação de frutos com compostos voláteis que apresentam elevada atividade antimicrobiana pode ser uma técnica complementar empregada em pós-colheita, visando reduzir as elevadas concentrações superficiais de inóculo.

Palavras-chave: pós-colheita; revestimento; *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; adjuvantes; quitosana; fumigação.

ABSTRACT

CANAVER, B.S. **Evaluation of chitosan and fumigation on the control of apple fruit decay (*Malus domestica* Borkh.) caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*.** Florianópolis, 2010.

Substantial losses in production are recorded in apple fruit during postharvest period. The usual methods for controlling fungal decay involve fruit immersion in fungicide solutions and refrigeration. In the search for alternative methods, the objective of this work was to evaluate the effects of natural compounds such as chitosan and short chain fatty acids on the decays caused by the fungi *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. The fruits were inoculated with a spore suspension of *P. expansum* or *B. cinerea* before (curative effect) or after (preventive effect) immersion in a suspension of chitosan or in the polysaccharide formulations. Treated fruits were stored at $25\pm1^{\circ}\text{C}$ under high relative humidity, and periodically evaluated for the incidence and severity of decay. *In vitro*, the effect of chitosan on mycelial growth, sporulation and spore germination was evaluated. The results indicated that the immersion of apple fruit in suspensions of chitosan at 0.25 and 0.5% decreased the severity of *Penicillium* decay in 54 and 74% for preventive treatment, respectively. In curative treatments, adjuvants were necessary to achieve good levels of reduction in the severity: the addition of glycerol at 3.0% in the suspension of chitosan (0.5%) decreased the *Penicillium* severity in 47.6% the *Penicillium* severity; chitosan formulation containing the polysaccharide at 0.25%, plus glycerol 0.75%, magnesium stearate 0.1% and Tween 80 0.1% was effective to reduce *P. expansum* and *B. cinerea* decays in 26.5 and 44.6%, respectively. By the other hand, the addition of calcium chloride or potassium carbonate to the suspensions of chitosan did not increase the efficiency of control of the suspensions against decay. *In vitro*, chitosan at 50 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ significantly inhibited spore germination and germ tube elongation of *P. expansum* and *B. cinerea*, respectively. Chitosans of low molecular weight (Qlmw) and commercial (Qcom) reduced mycelial growth and stimulated the sporulation of *B. cinerea* on PDA. The peroxidase activity in apple tissues inoculated with *P. expansum* was higher than in non-inoculated tissues, but there was no effect of chitosan on the peroxidase or polyphenol oxidase activities in fruit. In the second stage of this work, the fumigation of apple fruit with formic, acetic and propanoic acids, ethanol and hexanal was evaluated. For that, a spore suspension of *P.*

expansum was deposited in the intact epidermis of the fruit. After drying, the fruits were fumigated during 30 min and wounded in the site of spore deposition. The fumigation of apple fruit with formic, acetic and propanoic acids was effective in reducing the severity of decay. The acids also completely inhibited the germination of the fungus in plates when used at $12 \mu\text{L.L}^{-1}$, showing potential to reduce the inoculum found both on the skin of the fruit and on the packaging. Thus, the results indicate that chitosan reduced the severity of decays mainly by the antibiotic activity of the polysaccharide on the fungi. The fumigation of fruits with volatile compounds that exhibit high antimicrobial activity may be a complementary technique employed in the post-harvest technology to reduce high concentrations of inoculum on the surface of utensils, equipment and packaging units.

Keywords: postharvest; coating; decay; *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; adjuvants; chitosan, fumigation.

Lista de tabelas

Tabela 1 –	Áreas com potencial de aplicação da quitosana.	13
Tabela 2 –	Origem dos reagentes utilizados nos experimentos <i>in vivo</i> , com suas respectivas fórmulas (FM) e pesos moleculares (PM).	22
Tabela 3 –	Resumo dos principais resultados observados quanto ao efeito da imersão dos frutos de macieira em suspensão de quitosana (Q), contendo ou não adjuvantes Tween 80 (T), sorbitol (S), estearato de magnésio (E), no controle de podridões pós-colheita.	48
Tabela 4 –	Efeito de concentrações de quitosana comercial (Qcom) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	70
Tabela 5 –	Efeito de concentrações de cloreto de cálcio (CaCl ₂) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	72
Tabela 6 –	Efeito de concentrações de quitosana comercial (Qcom) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Botrytis cinerea</i> em lâminas escavadas.	74
Tabela 7 –	Efeito de diferentes concentrações das quitosanas comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm), médio peso molecular (Qmpm) e de alta densidade (Qad) sobre o crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> em meio BDA.	74
Tabela 8 –	Avaliação da esporulação média de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>in vitro</i> , em meio de cultura BDA incorporado com as	76

	quitosanas comercial (Qcom), de alta densidade (Qad), de médio peso molecular (Qmpm) e de baixo peso molecular (Qbpm) na concentração de 0,1% (m/v).	
Tabela 9 –	Origem dos reagentes utilizados nos experimentos de fumigação com suas respectivas fórmulas (FM) e pesos moleculares (PM).	88
Tabela 10 –	Efeito da fumigação com ácido fórmico sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	91
Tabela 11 –	Efeito da fumigação com ácido acético sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	91
Tabela 12 –	Efeito da fumigação com ácido propanóico sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	92
Tabela 13 –	Efeito da fumigação com etanol sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas.	93

Lista de figuras

Figura 1 –	Estrutura química da quitina (A) e da quitosana (B).	12
Figura 2 –	Influência do solvente da suspensão de quitosana na severidade da podridão de <i>Penicillium expansum</i> em frutos de macieira cv. Fuji, representada pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença. Os frutos foram imersos em suspensões de quitosana (Q) a 0,5% (m/v) dissolvidas em ácido acético (A), ácido clorídrico (C), ácido láctico (L) ou ácido cítrico (Ci), diluídos a 0,05 M, e inoculados com <i>Penicillium expansum</i> (10^5 conídios.mL ⁻¹). No controle, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, clorídrico, láctico ou cítrico) ou em água destilada. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.	29
Figura 3 –	Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não com Tween 80 (T), estearato de magnésio (E) e glicerol (G) no controle da podridão de <i>Penicillium expansum</i> . A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.	31
Figura 4 –	Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não aos adjuvantes glicerol (G), sorbitol (S), estearato de magnésio (E) e Tween 80 (T) no controle da	32

podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias + desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

Figura 5 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não aos adjuvantes Tween 80 (T) e estearato de magnésio (E) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 33

Figura 6 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q), associadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 34

Figura 7 – Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em solução de cloreto de cálcio (Ca) a 1,5% (m/v), em suspensão de quitosana (Q) a 0,25% ou 0,5% (m/v) ou em misturas contendo cloreto e quitosana, para o controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio- 35

- padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.
- Figura 8 –** Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 36
- Figura 9 –** Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes Tween 80 (T) ou glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 37
- Figura 10 –** Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos. 38
- Figura 11 –** Efeito curativo da imersão de maçãs da 39

cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

Figura 12 –

Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes sorbitol (S), estearato de magnésio (E) e oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

40

Figura 13 –

Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E), glicerol (G) e sorbitol (S) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos

42

- sintomáticos.
- Figura 14 –** Influência do solvente da suspensão de quitosana na severidade da podridão de *Botrytis cinerea* em frutos de macieira cv. Fuji, representada pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença. Os frutos foram imersos em suspensões de quitosana (Q) a 0,5% (m/v) dissolvidas em ácido clorídrico (C), ácido láctico (L) ou ácido acético (A), diluídos a 0,05 M (pH 5,6) e inoculados com *Botrytis cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹). No controle, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, clorídrico ou láctico) ou em água destilada. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 43
- Figura 15 –** Efeito preventivo da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensão de quitosana (Q) combinada ou não com carbonato de potássio (KC) no controle da podridão de *Botrytis cinerea*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos. 44
- Figura 16 –** Efeito curativo da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensão de quitosana (Q) a 0,5% (m/v), dos sais cloreto de cálcio (Ca) a 2,0% (m/v) e carbonato de potássio (KC) a 2,0% (m/v), e da combinação de quitosana a 0,25% com os sais a 1,0% no controle da podridão de *Botrytis cinerea*. A imersão em água destilada foi utilizada como 46

	controle. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.	
Figura 17 –	Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes glicerol (G), estearato de magnésio (E), Tween 80 (T), sorbitol (S) e oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de <i>Botrytis cinerea</i> . A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.	47
Figura 18 –	Reação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio catalisada pela enzima peroxidase, formando tetraguaiacol.	68
Figura 19 –	Reação de oxidação do catecol a benzoquinona, catalisada pela enzima polifenoloxidase.	68
Figura 20 –	Efeito de concentrações de quitosana comercial Qcom (0,05; 0,1; 0,25 ou 0,5% - m/v) na formação de colônias de <i>P. expansum</i> , 7 dias após a repicagem da suspensão de esporos em BDA. HCl 0,05 M (pH 5.6), incorporado ao meio de cultura, foi utilizado como testemunha. Houve efeito de concentrações de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R ² significativo pelo teste-t, ao nível de 5% de significância.	71
Figura 21 –	Efeito de concentrações de glicerol (0, 0,25, 0,75, 1,5 e 3,0%) sobre a germinação de esporos de <i>Penicillium</i>	72

	<i>expansum</i> em lâminas escavadas. Não houve efeito de concentrações pelo teste F a 5%.	
Figura 22 –	Efeito de concentrações de Tween 80 (0, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,5%) sobre a germinação de esporos de <i>Penicillium expansum</i> em lâminas escavadas. Não houve efeito de concentrações pelo teste F a 5%.	73
Figura 23 –	Efeito da incorporação das quitosanas de médio peso molecular (Qmpm), de alta densidade (Qad), comercial (Qcom) e de baixo peso molecular (Qbpm), na concentração de 0,1% (m/v), em meio de cultura BDA, sobre o crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> . Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.	75
Figura 24 –	Efeito de diferentes concentrações das quitosanas de baixo peso molecular (Qbpm), comercial (Qcom), de médio peso molecular (Qmpm) e de alta densidade (Qad) sobre a esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> em meio BDA.	77
Figura 25 –	Atividade de peroxidases em tecidos de maçã retirados no local da inoculação com <i>P. expansum</i> (símbolos preenchidos) ou em local próximo à inoculação, em frutos de macieira cv. Fuji imersos em formulações de quitosana a 0,25% (Q), combinadas ou não com sorbitol a 0,75% (S), Tween 80 a 0,1% (T) e estearato de magnésio a 0,1% (E). Frutos imersos em HCl 0,05 M pH 5,6 foram utilizados como controle (C). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.	78
Figura 26 –	Atividade de polifenoloxidases em	79

tecidos retirados no local da inoculação com *P. expansum* (símbolos preenchidos) ou em local próximo à inoculação, em frutos de macieira cv. Fuji imersos em formulações de quitosana a 0,25% (Q), combinadas ou não com sorbitol a 0,75% (S), Tween 80 a 0,1% (T) e estearato de magnésio a 0,1% (E). Frutos imersos em HCl 0,05 M pH 5,6 foram utilizados como controle (C). Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste F a 5% de significância.

- Figura 27 –** Severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira cv. Fuji após inoculação com 10^6 esporos.mL⁻¹ e fumigação por 60 minutos com ácido acético, etanol, ou ácido fórmico, nas concentrações de 5 e 10 µL por L de ar, sob temperatura ambiente. Água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos. 94
- Figura 28 –** Severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira cv. Fuji após inoculação com 10^6 esporos.mL⁻¹ e fumigação por 60 minutos com ácido acético (5 µL), ácido fórmico (2,5 µL), ácido propanóico (5 µL e 10 µL), etanol (20 µL), hexanal (20 µL) por litro de ar, sob temperatura ambiente. Água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos. 95

Lista de abreviaturas

AACPD – Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
ABPM – Associação Brasileira de Produtores de Maçã
BRDE – Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul
BPF – Boas Práticas de Fabricação
BDA – Batata Dextrose Agar
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CO₂ – dióxido de carbono
°C – graus celsius
cm² – centímetro quadrado
cv. – cultivar
DO – Densidade Óptica
DL₅₀ – dose letal 50%
DCD – Diário da Câmara dos Deputados
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA – *Food and Drug Administration*
GRAS – *Generally recognized as safe*
g.Kg⁻¹ – relação grama por quilograma
g – grama
HCl – ácido clorídrico
HLB – Balanço Hidrofílico-Lipofílico
HPMC – hidroxipropilmetilcelulose
H₂O_{dest} – água destilada
IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas
ICEPA – Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
kDa – quilo Dalton
K₂CO₃ – carbonato de potássio
mm – milímetros
m/v – relação massa volume
mL – mililitro
M – Molar
mM – milimolar
NaOH – hidróxido de sódio
NaCl – cloreto de sódio
O₂ – oxigênio
pH – potencial hidrogeniônico
ppm – parte por milhão

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonil

PVPP – polivinil polipirrolidona

prot – proteína

POX – peroxidase

PIB – Produto Interno Bruto

PIF – Produção Integrada de Frutas

PCB's – Bifenil policlorados

Qbpm – quitosana de baixo peso molecular

Qcom – quitosana comercial

Qmpm – quitosana de médio peso molecular

Qad – quitosana de alta densidade

s – segundos

v/v – relação volume volume

% – percentagem

μL – microlitro

ERO – Espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	01
HIPÓTESES	03
OBJETIVOS	
Geral	03
Específicos	04
 CAPÍTULO I – Caracterização dos patossistemas e considerações gerais sobre os agentes antimicrobianos	
1.1 A cultura da macieira	05
1.2 A cultivar Fuji	06
1.3 Podridões pós-colheita em frutos	07
1.4 Quitina e quitosana - considerações gerais	11
1.5 Sais inorgânicos	14
 CAPÍTULO II - Atividade antifúngica de revestimentos e formulações de quitosana para o controle das podridões pós-colheita causadas por <i>Penicillium expansum</i> e <i>Botrytis cinerea</i> em frutos de macieira	
2.1 Introdução	16
2.2 Material e métodos	21
2.2.1 Obtenção dos frutos de macieira, dos fitopatógenos, da quitosana e dos reagentes	21
2.2.2 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>P. expansum</i>	23
2.2.2.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de <i>Penicillium</i>	23
2.2.2.2 Influência da adição dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio nas suspensões de quitosana para o controle da podridão de <i>P. expansum</i>	24
2.2.3 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>P. expansum</i>	25
2.2.3.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>P. expansum</i>	25
2.2.3.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol,	25

Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>P. expansum</i>	
2.2.4 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>B. cinerea</i>	27
2.2.4.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de <i>Botrytis</i>	27
2.2.4.2 Efeito da incorporação de carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	27
2.2.5 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>B. cinerea</i>	28
2.2.5.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio ou carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	28
2.2.5.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	28
2.3 Resultados	29
2.3.1 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>P. expansum</i>	29
2.3.1.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de <i>Penicillium</i>	29
2.3.1.2 Influência da adição dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio nas suspensões de quitosana para o controle da podridão de <i>P. expansum</i>	30
2.3.2 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>P. expansum</i>	34
2.3.2.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>P. expansum</i>	34
2.3.2.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle curativo da podridão de <i>P. expansum</i>	36
2.3.3 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>B. cinerea</i>	42
2.3.3.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de <i>Botrytis</i>	42
2.3.3.2 Efeito da incorporação de carbonato de potássio à	44

suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	
2.3.4 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de <i>B. cinerea</i>	45
2.3.4.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio ou carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	45
2.3.4.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de <i>B. cinerea</i>	46
2.4 Discussão	48

CAPÍTULO III - Avaliação dos mecanismos de ação da quitosana envolvidos na redução da severidade de podridões em frutos de macieira

3.1 Introdução	59
3.2 Material e Métodos	63
3.2.1 Obtenção das quitosanas, reagentes e fitopatógenos	63
3.2.2 Obtenção dos frutos de macieira	64
3.2.3 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de quitosana contra <i>P. expansum</i>	64
3.2.4 Avaliação do efeito de cloreto de cálcio, glicerol e Tween 80 sobre a germinação de esporos de <i>P. expansum</i>	65
3.2.5 Avaliação da atividade antifúngica da quitosana <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i>	66
3.3 Efeito da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensões de quitosana combinadas ou não com sorbitol, Tween 80, ou estearato de magnésio na atividade de peroxidases e polifenoloxidases	67
3.4 Análise estatística	69
3.5 Resultados	69
3.5.1 Avaliação do efeito de quitosana sobre a germinação de conídios e a formação de colônias de <i>P. expansum</i>	69
3.5.2 Avaliação do efeito de cloreto de cálcio, glicerol e Tween 80 sobre a germinação de esporos de <i>P. expansum</i>	71
3.5.3 Avaliação da atividade antifúngica da quitosana <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i>	73
3.6 Efeito da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensões de quitosana combinadas ou não com sorbitol,	77

Tween 80, ou estearato de magnésio na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

3.7 Discussão

79

CAPÍTULO IV - Avaliação do efeito da fumigação de compostos voláteis no controle da podridão de *Penicillium expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

4.1 Introdução

85

4.2 Material e Métodos

87

4.2.1 Obtenção dos frutos de macieira, reagentes e fitopatógeno

87

4.2.2 Efeito da fumigação, *in vitro*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico ou etanol sobre a germinação de esporos de *P. expansum*

88

4.2.3 Efeito da fumigação, *in vivo*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico, e com hexanal ou etanol sobre a incidência e severidade da podridão de *P. expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

89

4.3 Resultados

90

4.3.1 Efeito da fumigação, *in vitro*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico ou etanol na germinação de esporos de *P. expansum*

90

4.3.2 Efeito da fumigação, *in vivo*, com ácidos fórmico, acético e propanóico, e com hexanal ou etanol sobre a incidência e severidade de *P. expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

93

4.4 Discussão

95

5 Conclusões

100

6 Referências

100

7 Apêndices

122

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que superou a casa das 43 milhões de toneladas em 2008, o que corresponde a 5% da produção mundial (IBRAF, 2008). Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (2008), o setor emprega 5,6 milhões de pessoas, equivalente a 27% da mão-de-obra agrícola, gera oportunidades de dois a cinco postos de trabalho na cadeia produtiva por hectare cultivado e está fundamentado em pequenas e médias propriedades.

Entre as principais frutas exportadas pelo Brasil em 2008, a uva ocupou o primeiro lugar, com 172 mil toneladas, seguida pelo melão, com 153 mil toneladas, manga, com 119 mil toneladas e a maçã, alcançando 80 mil toneladas. O estado de Santa Catarina destaca-se no ranking nacional como o primeiro produtor de maçãs, respondendo por 52% desta produção, em uma área colhida de 19.817 hectares, alcançando uma produção de 622,5 mil toneladas (ICEPA, 2010). Dentro deste contexto, a fruticultura de clima temperado apresenta-se como uma alternativa às unidades de produção familiar do Planalto Catarinense, gerando renda e possibilitando a ocupação e o uso adequado do solo.

O baixo consumo per capita de frutas in natura no Brasil, aliado à necessidade de evitar os prejuízos econômicos vinculados à sazonalidade de produção, levam o produtor a optar pelo uso do armazenamento refrigerado em câmaras frigoríficas, associado ou não ao uso de atmosfera controlada, o que possibilita um escoamento constante e contínuo da produção. No entanto, a manipulação inadequada dos frutos na colheita e o armazenamento incorreto auxiliam no processo de infecção e desenvolvimento de doenças, deteriorando o produto comercial.

Estima-se que as perdas da produção de frutas armazenadas atinjam cifras de até 35% no período denominado pós-colheita. Mesmo quando utilizadas todas as recomendações de manejo, esse volume atinge 0,5 a 3% das maçãs frigorificadas (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004). Geralmente essas podridões são ocasionadas pelo ataque de patógenos, dos quais se destacam os fungos *Penicillium expansum* (Link) Thom. e *Botrytis cinerea* Pers.

Uma tecnologia emergente que tem a capacidade de reduzir doenças em pós-colheita é o emprego de compostos derivados de produtos naturais. O potencial de exploração desses compostos no

controle de podridões pós-colheita se deve principalmente às suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Estudos sugerem que os mecanismos de ação envolvidos estão associados ao efeito antimicrobiano direto, fungistático ou pela ativação de mecanismos latentes de resistência de plantas em resposta ao tratamento com estes elicitores.

A ativação dos mecanismos de defesa das plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos vegetais, preparações de leveduras e ainda raças não virulentas do patógeno. Podem-se ainda utilizar outros elicitores químicos ou físicos, como ácido salicílico (WANG et al., 2006), ácido jasmônico (GERSHENZON, 2002), metil jasmonato (MOLINE et al., 1997), bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio (NIGRO et al., 2006) ou luz em comprimentos de onda específicos.

Em função de alguns desses compostos serem facilmente volatilizados, eles podem ser empregados no controle de fitopatógenos no período pós-colheita através do uso da técnica de fumigação. Compostos voláteis, tais como timol (CHU et al., 1999), acetaldeído (AVISSAR; PESIS, 1991), benzaldeído (WILSON et al., 1987), cinamaldeído (UTAMA et al., 2002) e metil-jasmonato (DROBY et al., 1999) tornam-se interessantes devido às suas propriedades antifúngicas e à possibilidade de utilização como agentes fumigantes.

Outra técnica comumente utilizada para o controle de podridões em frutos é a imersão em soluções fungicidas. A atividade antimicrobiana de sais de bicarbonato contra patógenos fúngicos é bem conhecida (HERVIEUX et al., 2002), assim como a de cloreto de cálcio (MICELI et al., 1999), ácido salicílico (WANG et al., 2006), ácido jasmônico (ANDRESEN et al., 1992) e a de alguns extratos de plantas medicinais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003), abrindo novas perspectivas para o tratamento de frutos com produtos de baixa toxidez.

Um produto que está sendo amplamente pesquisado por possuir tanto propriedades antimicrobianas diretas como a capacidade de induzir respostas de defesa em plantas, é o polissacarídeo quitosana. Obtida a partir da deacetilação da quitina, a quitosana têm sido explorada para controlar doenças em pré e em pós-colheita. Bhaskara Reddy et al. (2000) observaram uma redução de infecções pós-colheita de *B. cinerea* em morangos que receberam pulverizações preventivas de quitosana em pré-colheita. Zhang e Quantick (1998) verificaram que o revestimento de morangos e framboesas com quitosana aumentou significativamente

a atividade de quitinases e β -1,3-glucanases comparadas com os frutos não revestidos.

A preocupação crescente da sociedade quanto às questões referentes ao ambiente e aos problemas de saúde pública associados ao uso contínuo de métodos convencionais de controle de doenças de plantas, além da preocupação da comunidade científica quanto à seleção de estirpes resistentes aos agrotóxicos registrados, leva a uma busca por métodos alternativos de controle.

E é justamente dentro deste contexto que o presente estudo está focado, buscando-se alternativas aos fungicidas convencionais para o controle de podridões dos frutos de macieira em pós-colheita, através da imersão de frutos em suspensões de quitosana, associadas ou não a adjuvantes, ou pela fumigação com ácidos.

HIPÓTESES

A imersão dos frutos de macieira em suspensões de quitosana, contendo ou não os adjuvantes glicerol, sorbitol, oleato de sorbitano, Tween 80 e estearato de magnésio, empregados individualmente ou em combinações, ou combinada com os sais cloreto de cálcio e carbonato de potássio reduzirá as podridões causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. A adição dos adjuvantes ou dos sais à suspensão de quitosana contribuirá para aumentar a sua eficiência de controle.

A fumigação de maçãs com os ácidos fórmico, acético e propanóico ou etanol e hexanal poderá controlar a podridão de *Penicillium* em frutos que apresentam alta concentração de esporos em sua epiderme.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensões de quitosana, contendo ou não adjuvantes, para o controle das podridões de *Penicillium* e *Botrytis* em pós-colheita, bem como avaliar o efeito da fumigação de compostos voláteis no controle da podridão de *Penicillium* em maçãs.

Específicos

- Avaliar o efeito de tratamentos preventivos ou curativos de frutos de macieira em suspensões de quitosana, combinadas ou não com adjuvantes, para o controle das podridões de *Botrytis* e *Penicillium*;
- Avaliar o efeito da adição de cloreto de cálcio e carbonato de potássio à suspensão de quitosana para o controle das podridões em frutos;
- Avaliar o efeito antimicrobiano de quitosana e dos adjuvantes glicerol e Tween 80 sobre os fitopatógenos *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*;
- Avaliar o efeito da fumigação com ácidos voláteis no controle da podridão de *Penicillium expansum* nos frutos de macieira;
- Determinar a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em frutos de macieira inoculados com *Penicillium expansum* e imersos em diferentes formulações contendo quitosana.

CAPÍTULO I - Caracterização dos patossistemas e considerações gerais sobre os agentes antimicrobianos

1.1 A cultura da macieira

A macieira é uma espécie frutífera, arbórea, lenhosa, decídua e temperada, pertencente à família botânica Rosaceae, que abrange cerca de 100 gêneros e mais de 2.000 espécies. As plantas apresentam folhas alternadas, simples, caducas, estipuladas, penínervas de bordos dentados. As flores são brancas ou rosas (6 a 8), inferovariadas, dispostas em inflorescência denominada umbela, pentâmeras, actinomorfas, hermafroditas e caracterizadas por dois a cinco carpelos. O cálice é persistente e a corola caduca. O fruto é um pomo, constituído por grande receptáculo carnudo que envolve os ovários, cujo endocarpo é coriáceo ou pétreo e contém uma única semente (LUCHI, 2002).

No país, o cultivo da macieira é realizado por mais de 2,3 mil produtores que se concentram basicamente na região Sul, predominantemente nos estados de Santa Catarina (1.627 produtores) e do Rio Grande do Sul, com cerca de 700 produtores (BRDE, 2005). A pomicultura nacional emprega atualmente mais de 135 mil pessoas de forma direta e indireta (IBRAF, 2007).

Na safra nacional 2008/09, foi colhido um volume de aproximadamente 1,2 milhão de toneladas de maçãs, numa área de 38 mil hectares (ICEPA, 2010). Desse total, Santa Catarina participou com 19.817 hectares e um volume de 622,5 mil toneladas (52,1%), Rio Grande do Sul com 16.278 hectares e 556,6 mil toneladas (42,8%), Paraná com 1.800 hectares (4,7%) e São Paulo com 146 hectares (0,4 %).

Levando-se em consideração o volume obtido de produção e de produtividade e o aumento nas exportações de maçã ao longo dos anos, a fruticultura de clima temperado apresenta-se como uma alternativa às unidades de produção familiar do Planalto Catarinense, gerando renda e possibilitando a ocupação e o uso adequado do solo. No estado de Santa Catarina, existem 2.018 fruticultores colhendo em 19.109 hectares (DCD, 2007). A maior produção por município ocorre em Fraiburgo (170 mil toneladas) com 90 fruticultores e 4.850 hectares. São Joaquim vem em seguida, com 145 mil toneladas, 1.150 fruticultores e 6.731 hectares, onde predominam as cultivares Gala com 47% e Fuji com 43% da área plantada.

1.2 A cultivar Fuji

A cultivar Fuji está entre as quatro novas cultivares de macieira mais promissoras, com uma grande aceitação pelo mercado e pelos produtores devido às suas propriedades organolépticas e à sua alta produtividade. Essa cultivar, introduzida no Brasil em 1967, é resultante do cruzamento entre “Ralls Janet” e “Delicious”, realizado por Niitsu em 1939, na Estação Experimental de Tohoku, Japão.

A planta é vigorosa, muito produtiva, apresentando ângulo de inserção semi-aberto dos ramos mestres com o líder central, porém é mais tardia na frutificação do que a “Gala” e é exigente em frio hibernar (CAMILO; DENARDI, 2002). Floresce entre a segunda quinzena de setembro e a primeira quinzena de outubro, dependendo do microclima, sendo mais precoce nas regiões mais frias. A maturação ocorre de final de março até a primeira quinzena de abril, sendo mais tardia em regiões mais frias (CAMILO; DENARDI, 2002).

O fruto é de tamanho médio a grande, redondo-oblató ou oblongo, com cavidade peduncular média, pouco profunda, cálice grande, aberto e pedúnculo médio. A epiderme é fina, de coloração rosa-pálida, estriada e lisa. A cor de fundo é esverdeada, tornando-se amarela quando próximo da maturação. A polpa é aromática, de coloração amarelo-clara, firme, crocante, muito suculenta, de sabor doce e agradável. A conservação em câmaras frias é muito boa, podendo se estender até 6 meses em atmosfera comum e por período mais longo (até 12 meses) em condições de atmosfera controlada (CAMILO; DENARDI, 2002).

A Fuji é uma cultivar muito importante para a pomicultura brasileira. Segundo Castellarnau (2004), em 2002, 43% da produção nacional de maçã pertencia a esta cultivar, correspondendo a um total de 362.040 toneladas. No entanto, a Fuji apresenta falta de adaptação climática nas regiões mais quentes (abaixo de 1.300m). Isto se reflete em floração desuniforme e espaçada, frutos achatados e com tamanhos desuniformes, cavidade pistilar aberta, facilitando a entrada de fungos que causam a podridão carpelar. É suscetível ainda à sarna (*Venturia inaequalis*) e à podridão amarga (*Glomerella cingulata*), porém é mais resistente ao oídio (*Podosphaera leucotricha*) do que a cultivar Gala e é resistente à mancha foliar da Gala causada por *Colletotrichum* sp.

Todavia, perdas substanciais da produção resultam de podridões pós-colheita, em virtude do manuseio inadequado dos frutos na colheita, transporte e armazenamento. As podridões causadas por *G. cingulata*

(Stoneman) Spauld. e Schrenk (podridão amarga), *Penicillium expansum* Link. (mofo azul), *Pezicula malicorticis* (H. Jacks.) Naunf. (podridão olho-de-boi) e *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) em frutos armazenados estão entre as mais significativas (BONETI et al., 1999).

1.3 Podridões pós-colheita em frutos

As frutas são órgãos que apresentam alta predisposição a distúrbios fisiológicos, a danos mecânicos e à ocorrência de podridões no período pós-colheita, principalmente devido ao seu alto teor de água e nutrientes e por manter ativos vários processos biológicos. Durante este período, os frutos que não são manipulados adequadamente e/ou tratados com inibidores microbianos eficientes podem perder a qualidade (DHINGRA, 1985).

Dentre os micro-organismos causadores de doenças, os fungos são a principal causa de perdas em maçãs (SPADARO et al., 2004). Mais de 150 espécies de fungos foram observadas durante o armazenamento de maçãs, em diferentes regiões produtoras do mundo (SASS, 1993). As doenças de maior ocorrência são o mofo azul (*Penicillium* spp.), a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*), a podridão amarga (*Glomerella cingulata*) e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*).

As alterações fisiológicas e os danos mecânicos causados nos frutos podem se tornar porta de entrada a patógenos, dentre os quais, os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Botrytis*, os quais despertaram o interesse devido à alta agressividade e dispersão, causando perdas substanciais da produção.

O mofo azul, causado por *P. expansum*, é uma das principais doenças em pós-colheita de maçãs (SNOWDON, 1990; JONES; ALDWINCKLE, 1990). Esta podridão é responsável por 80 a 90% das perdas ocasionadas por podridões em pós-colheita (VINAS et al., 1998). No Brasil, este fungo é considerado o principal agente causador de podridões durante o armazenamento de maçãs e, se encontra difundido em todas as regiões produtoras (BLEICHER; BERNARDI, 1985), causando perdas de 0,5 a 3% nas maçãs armazenadas (VALDEBENITO SANHUEZA, 1991), podendo afetar os frutos durante o armazenamento, transporte e comercialização (BONETI et al., 1999). Mesmo quando efetuados todos os tratamentos culturais recomendáveis, as perdas causadas por *P. expansum* na cultivar Fuji podem atingir até 8%, após 6 meses de frigorificação (EMBRAPA, 2004).

O fungo *P. expansum* pode crescer e se desenvolver a partir de temperaturas próximas a 0°C, com temperatura ótima de crescimento em torno dos 25°C (PITT; HOCKING, 1997). Geralmente infecta os frutos acometidos por danos mecânicos devido à manipulação inadequada durante a colheita ou manuseio (SPOTTS; CERVANTES, 1986), danos causados por insetos e, ocasionalmente, através das lenticelas, principalmente quando os frutos passaram por estresse hídrico no período próximo à colheita ou estão em processo avançado de senescência. A infecção também pode ocorrer através da região do pedúnculo, do cálice aberto ou das lenticelas (AMIRI; BOMPEIX, 2005).

O local de penetração do patógeno apresenta-se como uma mancha aquosa e translúcida, adquirindo coloração bege-claro tanto na epiderme como na polpa. O tecido afetado pode ser facilmente destacado da parte sadia do fruto. Com a evolução da doença e em condições ambientais favoráveis, há o surgimento de sinais de coloração branca, evoluindo para a cor azul-esverdeada sobre as lesões, indicando a esporulação do patógeno.

Os esporos podem sobreviver de uma safra para outra em sacolas de colheita, bins e nas câmaras de armazenamento. O fungo sobrevive também como micélio em restos de tecido infectado aderido à madeira de bins, caixas, materiais de embalagem ou às paredes das câmaras frigoríficas, caso estas não sejam adequadamente desinfestadas de uma safra a outra.

A contaminação dos frutos pode ocorrer no pomar, durante a embalagem ou nas câmaras de armazenamento (AMIRI; BOMPEIX, 2005). Geralmente, o inóculo inicial dos patógenos que causam podridão pós-colheita encontra-se na população superficial do fruto e/ou das folhas que, ocasionalmente, acompanham as frutas na colheita e ainda no próprio local onde são manuseadas ou armazenadas (VALDEBENITO SANHUEZA, 1996). A água utilizada nas operações de *packing-house* pode remover e concentrar os propágulos do fungo presentes na superfície dos frutos, solo e restos de folhas (SPOTTS; CERVANTES, 1986; SANDERSON; SPOTTS, 1995), podendo aumentar a incidência das podridões.

Algumas espécies de *Penicillium*, principalmente *P. expansum*, produzem uma toxina denominada patulina, a qual apresenta efeitos carcinogênicos e mutagênicos. Geralmente, verifica-se uma maior produção da toxina nas condições favoráveis ao crescimento do fungo, ou seja, atividade de água em torno de 0,95 e temperatura entre 20 e

25°C. Porém, foi observado que o fungo pode produzir patulina sob refrigeração, comumente empregada na armazenagem dos frutos. Wilson e Nuovo (1973) isolaram 60 cepas de *P. expansum* produtoras de patulina em maçãs sintomáticas, mantidas a 0°C. Normalmente essa toxina é encontrada em altas concentrações não apenas na parte afetada do fruto, mas na sua parte sadia e em torno das lesões (SCUSSEL, 1998).

Outro fitopatógeno importante nesse período, o fungo *B. cinerea*, é responsável pela doença denominada podridão por *Botrytis* ou mofo cinzento. Atua em uma faixa ampla de temperatura, estando ativo mesmo em temperaturas próximas a 0°C. Possui a capacidade de se manter latente por um determinado período na fruta e provocar a lesão durante o armazenamento refrigerado (BONETI et al., 1999). O fungo sobrevive no pomar sobre qualquer tecido infectado da própria planta ou de plantas hospedeiras, desenvolvendo-se saprofiticamente em ramos, folhas e flores (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004). Uma fonte de inóculo comum são os frutos mumificados nas plantas ou os restos culturais no solo.

Os conídios são disseminados a longas distâncias através dos frutos infectados e pelo vento dentro dos pomares. Contudo, a via de disseminação mais comum ocorre nos procedimentos de pós-colheita, através da água de lavagem antes das operações de empacotamento e armazenagem. A maior incidência dessa doença está associada à ocorrência de folhas junto às frutas nos bins (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004), de restos florais ou de pedúnculo ou carpelos colonizados pelo patógeno.

Ferimentos na epiderme dos frutos, lesões ocasionadas por insetos, aberturas naturais como lenticelas ou o extremo floral muito aberto, favorecem a penetração e colonização do tecido pelo fungo nos locais de armazenagem.

O aspecto típico da doença é a ocorrência de uma podridão de textura firme, relativamente seca, irregular, não deprimida e geralmente profunda. Na epiderme e na polpa, apresenta cor bege, inicialmente clara, sem margens definidas. Com o avanço do apodrecimento, a lesão se torna marrom-escura, com as bordas mais claras. Na epiderme desenvolve-se um micélio branco de aspecto “cotonoso”, que pode vir a recobrir completamente o fruto e, em condições favoráveis, apresenta setores de aspecto pulverulento e coloração acinzentada que surgem a partir das lenticelas, onde se encontram os esporos do fungo.

Os frutos completamente podres aparentam ter sido amassados e exalam um odor de cidra doce. Algumas estirpes podem desenvolver estruturas escuras (microesclerócios) na superfície dos frutos atacados (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004).

Por ser um patógeno em pós-colheita, que possui a capacidade de iniciar uma penetração diretamente pela epiderme dos frutos, frequentemente é possível observar a formação de “ninhos” de podridões, ou seja, grupos de frutos afetados unidos pelo micélio cinzento de *Botrytis* nos locais de armazenamento (VALDEBENITO SANHUEZA, 2004).

Várias medidas vêm sendo adotadas com o intuito de reduzir as podridões pós-colheita, dentre as quais destacam-se o controle químico (inibidores de amadurecimento, fungicidas sistêmicos e protetores), o controle biológico (antagonistas), o controle físico (refrigeração, tratamento térmico, radiação, atmosfera controlada ou modificada) e a indução de resistência (eliciadores bióticos e abióticos).

Em pós-colheita de maçãs, o controle de doenças geralmente é feito com a imersão de frutos em soluções fungicidas. Fungicidas sintéticos como tiofanato-metílico, iprodiona e imazalil (ingredientes ativos) são utilizados para o controle de podridões deste período. Existem dois produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle do bolor azul (*P. expansum*) e três para o controle do mofo cinzento (*B. cinerea*), sendo que os três possuem o tiofanato-metílico como ingrediente ativo e a indicação do uso, preferencialmente, em pré-colheita (AGROFIT, 2010).

Entretanto, o aumento do interesse público e das autoridades da área da saúde sobre a presença de resíduos de pesticidas em produtos agrícolas e o acúmulo dessas substâncias no ambiente têm estimulado a pesquisa de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. Outras desvantagens do emprego de fungicidas advêm da seleção de estirpes de fitopatógenos resistentes aos ingredientes ativos registrados. Existe ainda um aumento do interesse e do incentivo de órgãos públicos no sentido dos produtores adotarem técnicas inseridas na Produção Integrada de Frutas.

Nesse contexto, a busca por meios alternativos de controle e inibição de fitopatógenos vem acompanhada de pesquisas na área de controle biológico e na indução de resistência, que envolve a ativação de mecanismos latentes de defesa da planta através de tratamento com elicitores bióticos e abióticos.

1.4 Quitina e quitosana - considerações gerais

A quitina (Figura 1A) é um polímero linear composto por unidades de 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucose (~95%) e 2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (~5%) unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Está amplamente distribuída e é encontrada abundantemente na natureza, fazendo parte da constituição do exoesqueleto de crustáceos (caranguejo, camarão, lagosta, krill, lulas) e da cutícula de insetos, em diatomáceas e algas marinhas, além da parede celular de alguns fungos pertencentes à divisão Basidiomycota, Ascomycota e Zygomycota.

Por sua vez, a quitosana (Figura 1B) é um polímero linear composto de unidades 2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (60~100%) e 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucose (0~50%), obtido através da deacetilação da quitina. A quantidade relativa dos dois monossacarídeos presentes no polímero de quitosana pode variar, dando origem a amostras com diferentes graus de deacetilação (60 a 95%), pesos moleculares (50 a 2.000 kDa), viscosidades, valores de pKa, entre outros.

A reação de deacetilação da quitina pode ser de natureza química por hidrólise alcalina ou biológica, através de enzimas microbianas denominadas quitina deacetilases (TSIGOS et al., 2000). Porém, o método mais empregado e comercialmente utilizado de obtenção da quitosana envolve a reação de deacetilação da quitina com NaOH a 40%, a 120 °C, por cerca de 3 horas (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que o cultivo de fungos como, por exemplo, *Aspergillus niger* em meio líquido pode fornecer uma fonte alternativa de quitosana. No entanto, as quitosanas obtidas dessas diferentes formas diferem entre si, enquanto que os grupos acetil na quitosana obtida a partir da quitina de crustáceos estão uniformemente distribuídos ao longo da cadeia do polímero, a quitosana com um grau semelhante de deacetilação isolada da parede celular de fungos possui resíduos de grupos acetil que estão agrupados em “clusters”.

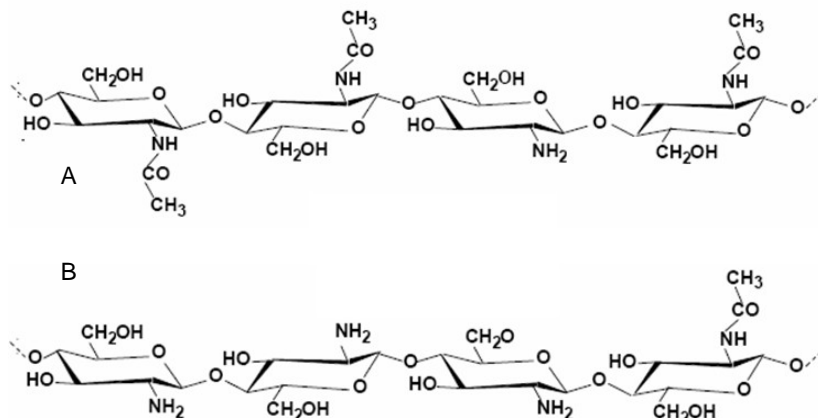


Figura 1 – Estrutura química da quitina (A) e da quitosana (B).

Os grupamentos amínicos originados na deacetilação do polímero de quitina que caracterizam o polissacarídeo quitosana, conferem ao polissacarídeo solubilidade em uma faixa específica de pH, geralmente inferior a 6, quando dissolvido em soluções aquosas da maioria dos ácidos orgânicos ou inorgânicos, originando soluções viscosas. Esses mesmos grupamentos tornam o polissacarídeo insolúvel em água, em solventes orgânicos ou em álcalis.

A viscosidade da suspensão de quitosana é afetada também pelo grau de deacetilação do polímero, pelo peso molecular, pela concentração do polissacarídeo em suspensão, pela concentração e tipo de solvente, e pela temperatura. Geralmente, um aumento na temperatura causa uma diminuição na viscosidade da suspensão.

Os biopolímeros de quitina e quitosana são biodegradados, na natureza, através da ação de enzimas hidrolíticas (lisozima, quitinase, quitina deacetilase, quitosanase), sendo possível encontrá-las presentes em plantas, em micro-organismos do solo e, no caso de lisozimas, nos fluidos corpóreos de alguns animais (lágrima, saliva e sangue). Kafetzopoulos et al. (1993) verificaram a ocorrência da enzima quitina deacetilase, responsável pela deacetilação do polímero de quitina, presente no fungo *Mucor rouxii*.

Algumas bactérias dos gêneros *Bacillus* (*B. megaterium* e *B. cereus*) e *Streptomyces* sp. e alguns fungos do gênero *Aspergillus* (CHENG; LI, 2000), possuem a capacidade de sintetizar enzimas quitinolíticas (quitinase e quitosanases) que atuam sobre a ligação β-(1-

4)-glicosídica dos polímeros de quitosana, originando oligômeros de menor massa molar.

O potencial de utilização (Tabela 1) do polissacarídeo quitosana reside no fato deste apresentar propriedades biológicas como baixa toxicidade (DL_{50} : dose letal via oral de 16 g.Kg^{-1} , em camundongos), biodegradabilidade e biocompatibilidade. Além disso, é uma substância que pode apresentar efeito anticoagulante, antifúngico e antimicrobiano.

Tabela 1 - Áreas com potencial de aplicação da quitosana

Área de aplicação	Descrição / Exemplo / Efeito
Tratamento de água	Quelante de metais pesados Floculante/Coagulante na remoção de corantes, proteínas, pesticidas, fenóis e PCB's de efluentes Filtração
Aditivos de cosméticos	Produtos dentários Xampus e condicionadores Loções e cremes protetores
Agricultura	Proteção bactericida de sementes Liberação agroquímica controlada Estabilizante de frutas e verduras perecíveis (pós-colheita)
Medicina / Farmácia	Efeito bactericida / antiviral Regeneração de ferimentos e lesões Agente cicatrizante Liberação controlada de drogas Materiais anticoagulantes do sangue (heparinóides) Regenerador de estrutura óssea Antiácido, redução do nível de ácido úrico Agente antigástrico Efeito hipocolesterolêmico Auxiliar no controle da pressão arterial (hipotensor) Pele artificial, lentes de contato
Alimentícia/ Nutricional	Estabilizante de aromas e cores Estabilizante de gorduras em preparos de alimentos Conservante e espessante natural

	Aditivos em alimentos para peixes e animais domésticos Fibra dietética Redução de absorção de lipídeos e de colesterol LDL
Indústria de alimentos (filmes e revestimentos)	Controle de temperatura e taxa de respiração das frutas (permeabilidade controlada) Controle de liberação de substâncias antimicrobianas Controle de liberação de antioxidantes Controle de liberação de nutrientes, condimentos e drogas
Biotecnologia	Agente imobilizante de micro-organismos, enzimas, células Meio de troca iônica Cromatografia Membranas artificiais Agente antimicrobiano (bactericida, fungicida)

Fonte: Adaptado de Kumar (2000) e Teng et al. (2001)

1.5 Sais inorgânicos

Vários sais inorgânicos são reconhecidos como agentes antimicrobianos ativos contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos. Os tratamentos pós-colheita com cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio mostram-se como uma alternativa segura e eficaz no controle de podridões de frutas e hortaliças. A atividade de sais de bicarbonato contra fungos está relatada (HERVIEUX et al., 2002) e os trabalhos recentes mostram que as aplicações em pós-colheita reduziram as podridões de armazenamento em melão (AHARONI et al., 1997), mamão (SIVAKUMAR et al., 2002), citros (PALOU et al., 2002; SMILANICK et al., 2005) e uva de mesa (MLIKOTA GABLER; SMILANICK, 2001).

A imersão de maçãs em solução de cloreto de cálcio é uma prática recomendada e muitas vezes praticada no pós-colheita. Segundo recomendações da Produção Integrada de Maçã (2005-2006), o uso do cloreto de cálcio 27% em pós-colheita é autorizado até o limite máximo

de 2.000 g em 100 L de água. O cálcio confere consistência à polpa, além de evitar desequilíbrios fisiológicos nos frutos associados à uma nutrição deficiente da planta-mãe. Segundo Inoue (2010), o cálcio é importante na composição estrutural da lamela média das paredes celulares, para a estrutura e função das membranas celulares por promover a ligação entre os grupos fosfato e carboxílicos dos fosfolípidos e proteínas, afetando-lhes a permeabilidade, seletividade, entre outros processos fisiológicos.

Hernández-Muñoz et al. (2008) avaliaram o efeito da adição de gluconato de cálcio em suspensões de quitosana (1% ou 1,5%) no revestimento de morangos, armazenados a 10°C e sob umidade relativa de 70±5%. Os frutos que foram revestidos com suspensões de quitosana a 1,5% (com ou sem a adição de gluconato de cálcio) ou 1% com adição de 0,5% de gluconato de cálcio não apresentaram sintomas de degradação por fungos após 6 dias de armazenamento. Por outro lado, 33,5% dos frutos do grupo controle apresentaram sintomas de degradação neste mesmo período. Eryani-Raqeeb et al. (2009) verificaram que a combinação dos tratamentos por infiltração a vácuo de cloreto de cálcio a 2,5% (m/v) e, posteriormente, imersão dos frutos de mamoeiro em suspensão de quitosana a 0,75% (m/v) reduziu a incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos armazenados a 13±1°C. Verificaram também que essa mesma combinação inibiu completamente a germinação de conídios *in vitro* e reduziu significativamente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em meio contido em placas de Petri.

CAPÍTULO II - Atividade antifúngica de revestimentos e formulações de quitosana para o controle das podridões pós-colheita causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* em frutos de macieira

2.1 Introdução

O mofo azul, causado por *P. expansum*, é uma das principais doenças em pós-colheita de maçãs (SNOWDON, 1990; JONES; ALDWINCKLE, 1990). No Brasil, este fungo é considerado o principal agente causal de podridões durante o armazenamento e encontra-se difundido em todas as regiões produtoras (BLEICHER; BERNARDI, 1985), causando perdas de 0,5 a 3% nas frutas armazenadas (VALDEBENITO SANHUEZA, 1991), podendo afetar os frutos durante o armazenamento, transporte e comercialização (BONETI et al., 1999).

Outro fitopatógeno importante nesse período, o fungo *Botrytis cinerea*, é responsável pela doença denominada mofo cinzento. Atua em uma faixa ampla de temperatura, estando ativo mesmo em temperaturas próximas a 0°C. Possui a capacidade de se manter latente por um determinado período na fruta e ocasionar perdas durante o armazenamento refrigerado (BONETI et al., 1999).

O controle pós-colheita de doenças em maçãs geralmente é feito com a imersão de frutos em soluções fungicidas. O emprego de soluções de hipoclorito de sódio e o armazenamento em câmaras frigoríficas com atmosfera controlada são práticas comuns em *packing houses* das regiões produtoras. No entanto, essas medidas nem sempre são suficientes para reduzir as perdas causadas por esses fitopatógenos em maçãs armazenadas. Além do mais, existe uma pressão crescente da sociedade no sentido de se empregar produtos atóxicos para o controle de doenças de plantas, especialmente na fase de pós-colheita.

Assim, o uso de filmes e revestimentos comestíveis, contendo substâncias antimicrobianas de origem natural e seus derivados, para o controle de podridões em pós-colheita está despertando cada vez mais o interesse de fitopatologistas, devido ao potencial que estes revestimentos apresentam em evitar a deterioração dos alimentos, preservando as características organolépticas e aumentando a vida de prateleira, além de serem, em muitos casos, biodegradáveis e não tóxicos aos humanos.

Os filmes são películas, geralmente finas, formadas separadamente do alimento e depois aplicadas sobre o mesmo. Como

revestimento, se compreende a pulverização ou imersão do alimento em uma suspensão ou emulsão que, após a evaporação do solvente, irá formar uma fina película sobre a superfície do produto.

Por se tratar de alimentos que serão consumidos diretamente pelos humanos e levando em consideração o tempo relativamente curto entre o tratamento e a ingestão, as formulações de filmes e revestimentos comestíveis deverão apresentar compostos reconhecidos como GRAS (*Generally recognized as safe*), seguros à saúde e ao meio ambiente pela Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA - *Food and Drug Administration*), e processados dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Os filmes e revestimentos comestíveis podem conter, em sua composição: (1) substâncias hidrocoloidais, como polissacarídeos ou proteínas que conferem características de baixa permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono, porém possuem baixa barreira ao vapor de água devido à natureza hidrofílica de muitos polissacarídeos e proteínas; (2) substâncias lipídicas, as quais apresentam baixa permeabilidade ao vapor de água devido à sua natureza hidrofóbica e, em alguns casos, baixa permeabilidade aos gases; e por fim (3) os compostos, que são adições de compostos hidrocoloidais com compostos lipídicos, podendo existir como camadas separadas ou associados.

Uma característica importante que as formulações devem apresentar é a capacidade de espalhamento ou molhabilidade. O termo molhabilidade é definido como sendo a manifestação macroscópica da interação molecular entre sólidos e líquidos em contato direto na interface entre eles (BERG, 1993) e está diretamente relacionada com as forças coesivas do líquido e as forças adesivas entre o sólido e o líquido. As forças coesivas do líquido tendem a formar uma gota esférica, já as forças adesivas entre o sólido e o líquido tendem a espalhar o líquido sobre o sólido.

A eficiência dos revestimentos comestíveis para frutas e hortaliças depende principalmente da capacidade da solução formadora de revestimento se dispersar homogeneamente sobre a superfície, a qual poderá afetar a espessura do revestimento formado (PARK, 1999), interferindo na permeabilidade e na resistência mecânica. Após a evaporação, os revestimentos deverão ter uma boa adesão, coesão, estabilidade e durabilidade adequada (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). Para tanto, faz-se necessário a adição ao

revestimento de compostos com características emulsificantes, plastificantes, estabilizantes e umectantes, entre outras propriedades.

Os plastificantes, por exemplo, são substâncias pouco voláteis que, quando adicionados a outro material, mudam suas propriedades físicas e/ou mecânicas. Em filmes e revestimentos comestíveis, os plastificantes mais usados são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, que atuam nas pontes de hidrogênio, reduzindo as forças intermoleculares entre cadeias poliméricas adjacentes (BANKER, 1966). O sorbitol é um poliól que pode ser encontrado na natureza em diversas frutas (maçãs, ameixas, cerejas, peras e pêssegos) ou sintetizado industrialmente por hidrogenação catalítica da glicose. Possui baixa massa molar e contém seis hidroxilas na sua estrutura química, possibilitando que este composto interaja intra e intermolecularmente (pontes de hidrogênio) nas cadeias poliméricas.

O glicerol também pertence à classe dos polióis e está presente em praticamente todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada ligado a ácidos graxos, como o ácido esteárico, oleico, palmítico e láurico para formar triacilglicerol ou fazendo parte da membrana celular na forma de fosfolipídeos (BOBBIO; BOBBIO, 2003). É reconhecido como seguro (DL₅₀, em ratos, de 470 mg.kg⁻¹) para o consumo humano desde 1959, podendo ser utilizado em diversos produtos alimentícios. Rodríguez et al. (2006) verificaram que a adição do glicerol ao filme tendo como base amido de batata aumentou a flexibilidade da película, facilitando o seu manuseio e evitando rachaduras.

Os surfactantes, por sua vez, são incorporados na formulação de filmes e revestimentos para reduzir a tensão superficial da solução e evitar a coalescência entre as gotas, melhorando a molhabilidade e aderência do filme (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Possuem a característica de serem anfílicos, ou seja, apresentam na molécula uma porção lipofílica apolar e uma parte hidrofílica polar. O equilíbrio entre as duas porções, ou seja o balanço hidrofílico/lipofílico, regula a funcionalidade do surfactante em interfaces e também sua influência nas propriedades dos filmes nos quais são incorporados.

Entre os surfactantes, o monooleato de sorbitana etoxilado 20 EO (Tween 80) possui a fórmula química C₆₄H₁₂₄O₂₇ com peso molecular de 1310 g.mol⁻¹, tem coloração amarelo claro em água e, possui valor do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 10,0 - 15,0 e as mesmas propriedades de um detergente tipo polietileno não-iônico (ROCHE, 2004). É composto por ésteres de sorbitana etoxilados derivados da

reação do sorbitol com ácidos graxos e óxido de eteno. São compostos tensoativos hidrofílicos com elevado balanço hidrofílico-lipofílico e a presença da cadeia de polioxietileno torna estes compostos solúveis ou dispersíveis em água. A compatibilidade entre o revestimento e a epiderme da maçã aumentou com a adição de Tween 80 a 0,1% à suspensão de quitosana a 1,5% (m/v), diminuindo a tensão superficial do líquido e aumentando, conseqüentemente, o coeficiente de espalhamento (CHOI et al., 2002). El Ghaouth et al. (1991) e Zhang et al. (1998) relataram o mesmo valor de concentração de Tween 80 para suspensões de quitosana a 1% (m/v). Carneiro-da-Cunha et al. (2009) concluíram que a adição do surfactante Tween 80 ao filme formado, tendo como base o polissacarídeo extraído da casca de *Anacardium occidentale* L. e o sorbitol como agente plastificante, foi capaz de reduzir as forças de coesão e, conseqüentemente, reduzir a tensão superficial, aumentando a molhabilidade e a compatibilidade entre a solução e a epiderme de frutos de macieira cv. Golden.

Outra classe de adjuvante inclui o estearato de magnésio, que é um composto hidrofóbico constituído de magnésio misturado com ácidos orgânicos obtidos de óleos e consiste em uma mistura, em proporções variáveis, de estearato de magnésio ($C_{36}H_{70}MgO_4$) e palmitato de magnésio ($C_{32}H_{70}MgO_4$). É amplamente utilizado em cápsulas e comprimidos como lubrificante, em concentrações que variam entre 0,25 e 2,0% (ZUURMAN et al, 1999; ROBERTS et al., 2004), embora possa ser usado em cosméticos e em produtos alimentares. Cervera et al. (2004) verificaram que a incorporação de agentes anti-aderentes (*anti-sticking*) levou a uma diminuição no tempo de aderência (*tackiness*) dos filmes de quitosana, contendo glicerol, utilizados como revestimento de *pellets*, sendo que o estearato de magnésio e o monoestearato de glicerol foram os mais eficazes.

Segundo Muzarelli (1986), a quitosana pode ser empregada na indústria alimentícia visando aumentar a vida de prateleira de frutas e vegetais frescos devido à sua propriedade de formar um biofilme envolvendo os alimentos e reduzindo assim as trocas gasosas. O revestimento por quitosana provavelmente modifica o meio interno sem causar a respiração anaeróbica, devido a sua propriedade de ser mais permeável ao O_2 do que ao CO_2 (BAI et al., 1988). A quitosana também pode reduzir a desidratação, atuando como uma barreira contra a perda de umidade (EL GHAOUTH et al., 2000).

A quitosana tem demonstrado ainda um efeito direto sobre o desenvolvimento de diversos fitopatógenos, com potencial para

aplicação como revestimento no controle de podridões pós-colheita. El Ghaouth et al (1991, 1992) observaram reduções de até 77 ou 60% das podridões causadas por *B. cinerea* ou *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, respectivamente, no revestimento de morangos com quitosana a 1,0 ou 1,5% (m/v). A incidência da podridão de *Botrytis* e de *Penicillium* em tomates tratados com quitosana a 1,0% foi de 45 e 60%, respectivamente, enquanto que na testemunha a incidência foi de 95 e 100% (LIU et al., 2007). No laboratório de Fitopatologia/CCA/UFSC, a quitosana vem demonstrando potencial para o controle de podridões em frutos de macieira, porém a percentagem de redução das doenças ainda é relativamente baixa.

A eficiência antimicrobiana de filmes de quitosana contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como agente de revestimento, associado com ácido esteárico e de filmes de quitosana com HPMC quimicamente modificados por ligação cruzada com ácido cítrico, que age como agente de reticulação polimérica, foram avaliados por Möller et al. (2004). Os autores observaram que os filmes de quitosana contendo HPMC, com ou sem ácido esteárico, inibiram completamente o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Por outro lado, uma perda na atividade antimicrobiana foi observada após a modificação química das ligações.

Outras pesquisas continuam buscando a melhor combinação de quitosana com outros polímeros formadores de filmes, sem que haja essas modificações nas ligações (XU et al., 2005). A adição de compostos lipídicos ao revestimento hidrofílico pode melhorar a eficiência desses revestimentos contra a perda de umidade. Vargas et al. (2006) adicionaram à suspensão de quitosana, ácido oleico e Tween 80 (0,1% v/v), em revestimentos de morangos da cv. Camarosa obtendo uma maior atividade antimicrobiana nas formulações de quitosana a 1% (m/v) combinadas com ácido oleico a 3% ou a 4% (v/v). As formulações, contendo quitosana e ácido oleico, reduziram a taxa de respiração durante o armazenamento refrigerado, aumentaram a resistência à perda de umidade e não induziram alterações na qualidade físico-química dos frutos.

Diante desses aspectos, o presente estudo objetivou verificar a eficiência das suspensões de quitosana, combinadas com agentes plastificantes (glicerol, sorbitol, oleato de sorbitano), surfactantes (Tween 80) e lubrificantes (estearato de magnésio) para o controle das podridões de *Penicillium* e *Botrytis* em frutos de macieira, através de tratamentos preventivos e curativos.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção dos frutos de macieira, dos fitopatógenos, da quitosana e dos reagentes

Os frutos da cultivar Fuji, classificados como pertencentes à Classe 120 e Categoria CAT1, foram cedidos pela Cooperativa Regional Agropecuária Serrana (Cooperserra), sediada no município de São Joaquim, Santa Catarina. A Cooperserra recebe e classifica frutos provenientes de pomares comerciais localizados nos municípios de São Joaquim, Bom Jardim da Serra, Urupema, Urubici e Bom Retiro.

Os frutos foram colhidos nas safras 2007/08 ou 2008/09 e permaneceram em câmaras frigoríficas com atmosfera controlada na Cooperserra. Periodicamente, algumas caixas de frutos da safra eram cedidas, ao longo do ano, para a realização dos testes *in vivo* no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Em Florianópolis, as caixas eram armazenadas, por um período de um a dois meses, em câmara refrigerada a 4°C, localizada no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da mesma Universidade, e usadas dentro deste período.

Os fitopatógenos *Penicillium expansum* Link e *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. foram isolados de frutos infectados e cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a 25±1°C, sob luz fluorescente e fotoperíodo de 12h. Frequentemente, os fitopatógenos eram reisolados de frutos inoculados e sintomáticos para manter a patogenicidade. Suspensões de esporos em água destilada foram obtidas de culturas com uma semana de idade para *P. expansum* e com duas semanas de idade para *B. cinerea* e ajustadas para a concentração de 10⁵ conídios.mL⁻¹ com o auxílio da câmara de Neubauer.

Quitosana comercial com 85% de deacetação (Qcom) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, e utilizada nos testes preventivos e curativos. Os demais reagentes foram adquiridos de diferentes empresas, conforme pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Origem dos reagentes utilizados nos experimentos *in vivo*, com suas respectivas fórmulas (FM) e pesos moleculares (PM).

REAGENTE	FM	PM	ORIGEM
Ácido acético P.A.	CH_3COOH	60,05	Proquimios Comercio e Indústria Ltda
Ácido cítrico P.A.	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$		Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)
Ácido clorídrico 37% P.A.	HCl	36,46	Cromoline Química Fina
Ácido láctico L 85% P.A.	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	90,08	Labsynth (marca Synth)
Carbonato de potássio	K_2CO_3	138,21	Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)
Cloreto de cálcio P.A. dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,01	Vetec Química Fina Ltda
Dextrose P.A.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	Quimibras Indústrias Químicas S/A (Reagen)
D(-)Sorbitol P.S.	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	182,17	Vetec Química Fina Ltda
Estearato de magnésio	$\text{C}_{36}\text{H}_{70}\text{MgO}_4$	591,27	Makeni Chemicals Com. de Prod. Quim. Ltda
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	Quimex Produtos Químicos
Monooleato de sorbitan etoxilado 20 EO (Tween 80)	$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	1310,0	Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)
Propano-1,2,3-triol (Glicerol) P.A.	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$	92,09	Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)

2.2.2 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *P. expansum*

2.2.2.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de *Penicillium*

Os frutos de macieira da cv. Fuji foram desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 2 minutos, lavados com água corrente e deixados secando ao ar. Em seguida, foram feridos com agulha (1 mm x 5 mm) em dois locais na região equatorial e imersos por 3 minutos nas suspensões de quitosana a 0,5% (m/v), preparadas pela dissolução do polissacarídeo em ácido acético, ácido clorídrico, ácido láctico ou ácido cítrico, utilizados a 0,05 M. As suspensões foram homogeneizadas sob agitação constante, à temperatura ambiente, em agitador magnético (modelo DI 03, DIST, Brasil) e tiveram o pH ajustado para 5,6 pela adição de hidróxido de sódio a 2 M. Após a secagem, os frutos foram inoculados com 25 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹), depositados nos locais de ferimento. Os frutos foram armazenados no interior de bandejas plásticas (Sanremo Top Stock 400x270x133 (mm), Brasil) fechadas, sob alta umidade relativa, e incubadas em sala de crescimento com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Na testemunha, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, ácido clorídrico, ácido láctico ou ácido cítrico) com pH corrigido para 5,6 ou em água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma bandeja com quatro frutos. Os experimentos foram avaliados periodicamente quanto à incidência e à severidade das doenças. Para tanto, em cada ferimento foi avaliado o diâmetro médio da lesão, realizando-se leituras em sentidos ortogonais com o auxílio de uma régua. A partir do valor médio do diâmetro das lesões ao longo do tempo, em cada repetição, calculou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), conforme Shaner e Finney apud De Capdeville et al. (2002): $\text{AACPD} = \sum [(y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)]$, onde y_i representa o diâmetro médio da lesão no tempo t_i , e y_{i+1} é o diâmetro da lesão no tempo t_{i+1} . A incidência foi calculada a partir do número de frutos que apresentavam sintomas em cada tratamento, pela fórmula: $\% \text{Incidência} = (\text{n}^\circ \text{ de frutos infectados} / \text{n}^\circ \text{ total de frutos}) \times 100$.

2.2.2.2 Influência da adição dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio nas suspensões de quitosana para o controle da podridão de *P. expansum*

No primeiro experimento, os frutos de macieira foram imersos nas seguintes suspensões: I) quitosana a 0,25% (m/v); II) quitosana a 0,25% com Tween 80 a 0,1% (v/v); III) quitosana 0,25% com Tween 0,1% e estearato de magnésio a 0,1% (m/v); IV) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,25% (v/v); V) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,25% e Tween 80 a 0,1%; VI) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75%.

No segundo experimento, os frutos foram imersos em: I) quitosana a 0,25%; II) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75%; III) quitosana a 0,25% combinada com glicerol a 0,75% e Tween 80 a 0,1%; IV) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,25%, Tween 80 a 0,1% e estearato de magnésio a 0,3%; V) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75% (m/v); VI) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75%, Tween 80 a 0,1% e estearato de magnésio a 0,3%.

No terceiro, os frutos foram imersos em suspensões de quitosana a 0,25% ou a 0,5%, combinadas ou não com Tween 80 a 0,1% ou com Tween 80 a 0,1% e estearato de magnésio a 0,1%.

No quarto experimento, os frutos foram imersos em suspensão de quitosana a 0,5% ou em suspensões a 0,5% combinadas com estearato de magnésio a 0,1 ou a 0,3% ou com oleato de sorbitano a 0,1 ou a 0,3% (v/v). Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%.

Nos quatro experimentos descritos neste item, as suspensões foram preparadas pela dissolução do polissacarídeo quitosana em HCl a 0,05 M e o pH foi ajustado para 5,6 com a adição de NaOH 2 M. Os tratamentos que continham estearato de magnésio foram homogeneizados por 5 minutos em liquidificador em alta rotação (Walita LiqFaz, modelo LQ080, Potência 350 W, 3 velocidades). A desinfestação inicial superficial dos frutos, o tempo de imersão dos frutos nas suspensões, a inoculação, a incubação e a avaliação da incidência e severidade da doença foram feitos de forma semelhante ao que foi descrito no item 2.2.2.1.

2.2.3 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *P. expansum*

2.2.3.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *P. expansum*

Os frutos de macieira da cv. Fuji foram desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 2 minutos, lavados com água corrente e deixados secando ao ar. Em seguida, foram feridos com agulha (1 mm x 5 mm) em dois locais na região equatorial e inoculados com 25 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹), depositados nos locais de ferimento. Após a secagem do inóculo, os frutos foram imersos por 3 minutos em solução de cloreto de cálcio a 1,5% (m/v) ou em suspensões de quitosana a 0,25% (m/v) combinada com cloreto de cálcio a 0,75% ou a 1,5%, ou em quitosana a 0,5% combinada ou não com cloreto de cálcio a 1,5%. Em seguida, os frutos foram armazenados no interior de bandejas plásticas fechadas, sob alta umidade relativa, e incubadas em sala de crescimento com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), no escuro. No controle, os frutos foram imersos em água destilada. As suspensões foram obtidas pela dissolução do polissacarídeo em HCl 0,05 M e o pH foi ajustado para 5,6 com a adição de NaOH 2,0 M. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma bandeja com quatro frutos. Os experimentos foram avaliados periodicamente quanto à incidência e à severidade da doença, conforme item 2.2.2.1.

2.2.3.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *P. expansum*

No primeiro experimento, os frutos de macieira inoculados foram imersos nas seguintes suspensões: I) quitosana a 0,25; II) quitosana a 0,5%; III) quitosana a 0,25% com estearato de magnésio a 0,1% (m/v); IV) quitosana a 0,5% com estearato de magnésio a 0,1%; V) quitosana a 0,25% com oleato de sorbitano 0,1% (v/v); ou VI) quitosana a 0,5% com oleato de sorbitano a 0,1%. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v).

No segundo, os frutos inoculados foram imersos em suspensões de quitosana a 0,25 ou a 0,5%, combinadas ou não com Tween 80 a 0,1% ou com glicerol a 0,75% (v/v).

No terceiro, os frutos inoculados foram imersos em suspensões de quitosana a 0,25% ou a 0,5%, combinadas ou não com glicerol a 1,5 ou a 3,0%.

No quarto experimento, os frutos inoculados foram imersos em I) quitosana a 0,25%; II) quitosana a 0,25% com estearato de magnésio a 0,1%; III) quitosana a 0,25% com estearato a 0,3%; IV) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75%; V) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75% e estearato a 0,1%; VI) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75% e estearato a 0,3%. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%.

No quinto, os frutos inoculados foram imersos nas seguintes formulações: I) quitosana a 0,25%; II) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75%; III) quitosana a 0,25% com sorbitol a 1,5%; IV) quitosana a 0,25% com sorbitol a 1,5% e estearato de magnésio a 0,1; V) quitosana a 0,25% com sorbitol a 1,5% e estearato a 0,3%; VI) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75% e oleato de sorbitano a 0,1%. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%.

No sexto experimento, os frutos inoculados foram imersos em: I) quitosana a 0,25%; II) quitosana a 0,25% com estearato de magnésio a 0,1% e glicerol a 0,75% ou III) glicerol a 1,5%; IV) quitosana a 0,25% com estearato de magnésio a 0,1% e sorbitol a 0,75 ou V) quitosana a 0,25% com estearato de magnésio a 0,1% e sorbitol a 1,5%. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%.

Nos seis experimentos descritos neste item, o solvente utilizado para a obtenção das suspensões foi o HCl 0,05 M (pH 5,6), enquanto que a desinfestação inicial superficial dos frutos, a inoculação, o tempo de imersão dos frutos nas suspensões, a incubação e a avaliação da incidência e severidade da doença foram feitos de forma semelhante ao descrito no item 2.2.2.1. Os tratamentos que continham estearato de magnésio foram homogeneizados por 5 minutos em liquidificador em alta rotação.

2.2.4 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *B. cinerea*

2.2.4.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de *Botrytis*

Os frutos de macieira da cv. Fuji foram desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 2 minutos, lavados com água corrente e deixados secando ao ar. Em seguida, foram feridos com agulha (1 mm x 5 mm) em dois locais na região equatorial e imersos por 3 minutos nas suspensões de quitosana a 0,5% (m/v) preparadas pela dissolução do polissacarídeo em ácido acético, ácido clorídrico ou ácido láctico utilizados a 0,05 M. As suspensões foram homogeneizadas sob agitação constante, à temperatura ambiente, em agitador magnético (modelo DI 03, DIST, Brasil) e tiveram o pH ajustado para 5,6 pela adição de NaOH 2 M. Após a secagem, os frutos foram inoculados com 25 μL de suspensão de esporos de *Botrytis cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹), depositados nos locais de ferimento. Os frutos foram armazenados no interior de bandejas plásticas (Sanremo Top Stock 400x270x133 (mm), Brasil) fechadas, sob alta umidade relativa, e incubadas em sala de crescimento com temperatura controlada ($25\pm 1^\circ\text{C}$). No controle, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, ácido clorídrico ou ácido láctico) com pH corrigido para 5,6 ou em água destilada. O delineamento experimental, o número de repetições e a avaliação da incidência e severidade da doença foram feitos de forma semelhante ao descrito no item 2.2.2.1.

2.2.4.2 Efeito da incorporação de carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

Os frutos de macieira cv. Fuji foram imersos nas seguintes formulações: I) solução de carbonato de potássio (K_2CO_3) a 1,5% (m/v); II) quitosana a 0,25% (m/v) com K_2CO_3 a 0,75%; III) quitosana a 0,25% com K_2CO_3 a 1,5%; IV) quitosana a 0,5% com K_2CO_3 a 1,5%; V) quitosana a 0,5%. As suspensões do polissacarídeo foram obtidas de forma semelhante ao descrito no item 3.2.4.1, empregando solução de ácido clorídrico a 0,05 M como solvente. A desinfestação inicial superficial dos frutos, o tempo de imersão dos frutos nas suspensões, a inoculação, a incubação e a avaliação da incidência e severidade da

doença foram feitos de forma semelhante ao que foi descrito no item 2.2.4.1.

2.2.5 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *B. cinerea*

2.2.5.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio ou carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

Os frutos de macieira da cv. Fuji foram desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 2 minutos, lavados com água corrente e deixados secando ao ar. Em seguida, foram feridos com agulha (1 mm x 5 mm) em dois locais na região equatorial e inoculados com 25 µL de suspensão de esporos de *Botrytis cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹), depositados nos locais de ferimento. Após a secagem do inóculo, os frutos foram imersos por 3 minutos em: I) suspensões de quitosana a 0,5% ou a 0,25%, adicionadas de II) cloreto de cálcio (CaCl₂) a 1,0% ou III) carbonato de potássio (K₂CO₃) a 1,0%; IV) solução de K₂CO₃ a 2,0%; V) solução de CaCl₂ a 2,0%; ou VI) água destilada. A desinfestação inicial superficial dos frutos, a inoculação, o tempo de imersão dos frutos nas suspensões, a incubação e a avaliação da incidência e severidade da doença foram feitos de forma semelhante ao descrito no item 2.2.2.1.

2.2.5.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

Os frutos de macieira inoculados com *B. cinerea* foram imersos em: I) quitosana a 0,25%; II) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75%; III) quitosana a 0,25% com glicerol a 0,75%, estearato de magnésio a 0,1% e Tween 80 a 0,1%; IV) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75%; V) quitosana a 0,25% com sorbitol a 0,75%, estearato a 0,1% e Tween 80 a 0,1%; VI) quitosana a 0,25% com oleato de sorbitano a 0,1% e Tween 80 a 0,1%. As suspensões foram preparadas pela dissolução do polissacarídeo em HCl 0,05 M (pH 5,6). A desinfestação inicial superficial dos frutos, a inoculação, o tempo de imersão dos frutos nas suspensões, a incubação e a avaliação da incidência e severidade da doença foram feitos de forma semelhante ao descrito no item 2.2.2.1.

2.3 Resultados

2.3.1 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *P. expansum*

2.3.1.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de *Penicillium*

A imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,5% (m/v) dissolvida nos ácidos lático ou clorídrico reduziu significativamente a incidência e a severidade da podridão de *Penicillium*, representada pela AACPD, quando comparado aos controles água destilada ou soluções ácidas (Figura 2). Em relação aos frutos imersos em água destilada, a suspensão de quitosana em HCl, o melhor tratamento, propiciou uma redução de aproximadamente 66% no número de frutos infectados e de 95% na severidade da podridão de *Penicillium* (Figura 2).

A imersão preventiva de maçãs em suspensão de quitosana dissolvida em ácido acético ou cítrico não teve influência sobre a atividade antifúngica da suspensão, não reduzindo significativamente a severidade da doença (Figura 2).

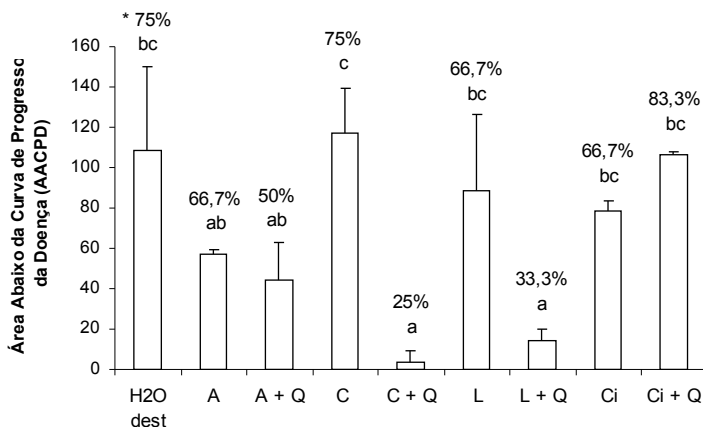


Figura 2 – Influência do solvente da suspensão de quitosana na severidade da podridão de *Penicillium expansum* em frutos de macieira cv. Fuji, representada pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença. Os frutos foram imersos em suspensões de quitosana (Q) a

0,5% (m/v) dissolvidas em ácido acético (A), ácido clorídrico (C), ácido láctico (L) ou ácido cítrico (Ci), diluídos a 0,05 M, e inoculados com *Penicillium expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹). No controle, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, clorídrico, láctico ou cítrico) ou em água destilada. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.1.2 Influência da adição dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio nas suspensões de quitosana para o controle da podridão de *P. expansum* por imersão dos frutos

No primeiro experimento, foram observadas menores incidência e severidade da podridão nos frutos de macieira imersos em suspensões de quitosana a 0,25% combinadas com glicerol a 0,25 ou a 0,75% (Figura 3). No caso da adição de glicerol a 0,25% na suspensão de quitosana, houve uma redução da severidade em torno de 62% e da incidência em 53%. Com o aumento da concentração de glicerol (0,75%) na suspensão, foi possível verificar uma redução de 79% na severidade e uma incidência baixa da doença (29,4%), 50% menor que a apresentada na testemunha absoluta. No entanto, esses tratamentos não diferiram estatisticamente da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo, a qual reduziu a severidade em 56% comparado com a testemunha (Figura 3). A adição de Tween 80 a 0,1% (v/v) na suspensão de quitosana a 0,25% (m/v) reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 45,2% comparada à imersão em água destilada, porém não houve diferença estatística entre esses tratamentos. As suspensões de quitosana a 0,25% adicionadas de Tween a 0,1% e combinadas com estearato de magnésio a 0,1% (m/v) ou glicerol a 0,25% (v/v) também não diferiram da testemunha, em termos de severidade. Nesses dois tratamentos, houve uma redução na severidade em 39,8% e 52,7%, respectivamente, comparada à severidade da testemunha (Figura 3).

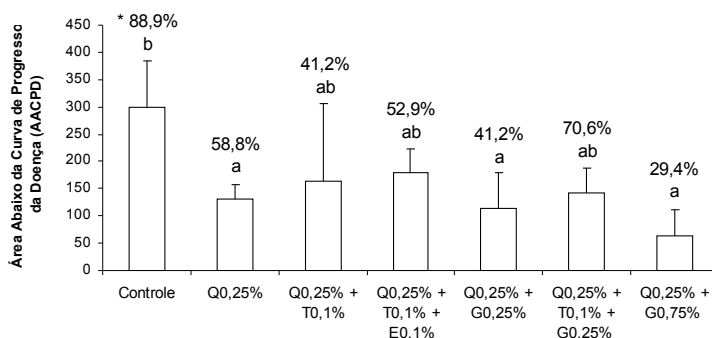


Figura 3 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não com Tween 80 (T), estearato de magnésio (E) e glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

No segundo experimento, a imersão dos frutos de macieira da cv. Fuji em suspensões de quitosana a 0,25% antes da inoculação com *P. expansum* não reduziu estatisticamente a severidade da podridão (Figura 4). Nesse caso, a adição de glicerol a 0,75% na suspensão de quitosana aumentou o nível de controle da podridão, reduzindo significativamente a severidade da doença, em torno de 60%, com relação à testemunha. A adição apenas de sorbitol a 0,75% na suspensão de quitosana reduziu a severidade em torno de 52% enquanto a incorporação de sorbitol a 0,75%, estearato a 0,3% e Tween 80 a 0,1% reduziu a severidade em 37%, mas esses tratamentos não diferiram da suspensão contendo apenas quitosana (Figura 4).

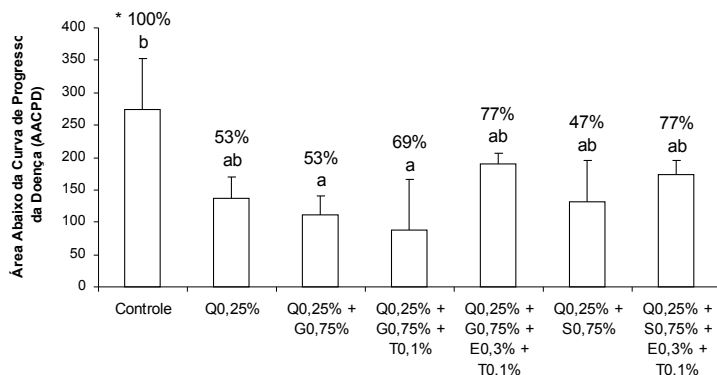


Figura 4 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não aos adjuvantes glicerol (G), sorbitol (S), estearato de magnésio (E) e Tween 80 (T) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias + desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

Comparando-se o efeito preventivo da imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,25 ou a 0,5%, combinadas ou não com adjuvantes, verifica-se que o aumento da concentração do polissacarídeo na suspensão resulta em menores índices de severidade (Figura 5). A imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25 ou a 0,5% reduziu a severidade, representada pela AACPD, em 56,9 ou 75,2%, respectivamente, comparada com a imersão em água destilada (controle). A adição de Tween 80 a 0,1% nas suspensões de quitosana a 0,25 ou a 0,5% reduziu a severidade em 28,8 ou 70,9%. Entretanto, a adição de Tween 80 na suspensão a 0,25% diminuiu a sua eficiência antimicrobiana, a qual não diferiu estatisticamente da testemunha em termos de severidade. Além disso, nesse tratamento houve um aumento da incidência (82%) de frutos com sintomas de podridão quando comparado à imersão dos frutos em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,25% (53%) (Figura 5). A incorporação de estearato de magnésio a 0,1% nas suspensões de quitosana a 0,25 ou a 0,5%, ambas com 0,1% de Tween 80, reduziu a severidade em 61,9 ou 63,3%, respectivamente (Figura 5).

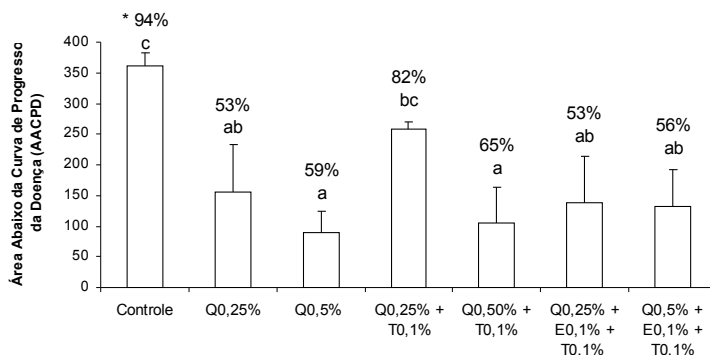


Figura 5 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) associadas ou não aos adjuvantes Tween 80 (T) e estearato de magnésio (E) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

O quarto experimento também mostra que o aumento da concentração do polissacarídeo na suspensão pode conferir uma maior proteção aos frutos por imersão, previamente à inoculação (Figura 6). A melhor formulação foi obtida pela adição de estearato de magnésio a 0,3% e Tween 80 a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,5%, reduzindo em 97,7% e em 75% a severidade e a incidência da podridão, respectivamente, diferindo significativamente da imersão em água destilada (controle) ou da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo (Figura 6). Na formulação contendo quitosana, estearato de magnésio a 0,1% e Tween a 0,1%, a severidade da podridão foi reduzida em 94% quando comparada ao controle. Quanto ao oleato de sorbitano, a incorporação deste composto à suspensão do polissacarídeo a 0,5%, nas duas concentrações avaliadas (0,1 ou 0,3%, v/v), reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 82,1 e 83,1%, respectivamente. Entretanto, nota-se que a redução conferida à suspensão pela incorporação do oleato não foi estatisticamente diferente da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo, embora tenha ocorrido uma redução na incidência que foi de 35% em ambos os tratamentos contendo quitosana e oleato contra 55% na suspensão contendo apenas quitosana. A imersão em suspensão de quitosana a

0,5% reduziu a severidade da doença em 72% comparada à testemunha (Figura 6).

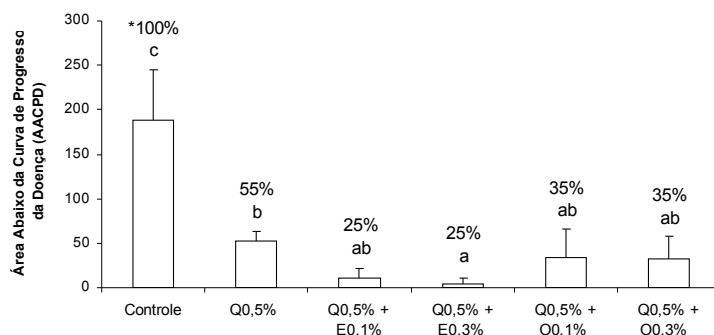


Figura 6 – Efeito preventivo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q), associadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.2 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *P. expansum*

2.3.2.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *P. expansum*

A imersão de frutos de macieira cv. Fuji inoculados com *P. expansum* em solução de cloreto de cálcio a 1,5% (m/v) não reduziu a severidade da podridão, representada pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença, quando comparada a imersão em água destilada (controle) (Figura 7). Entretanto, foi verificada uma redução da severidade quando os frutos foram imersos em suspensão de quitosana a 0,5% (m/v), que conferiu uma redução de 36% em relação à testemunha absoluta. Suspensões com a metade da concentração de quitosana (0,25%) e com a adição do cloreto de cálcio, nas concentrações de 0,75

ou 1,5%, não diferiram estatisticamente da testemunha, evidenciando que não houve um aumento na eficiência antimicrobiana das suspensões do polissacarídeo com a adição do cloreto de cálcio nas concentrações testadas contra o fitopatógeno (Figura 7).

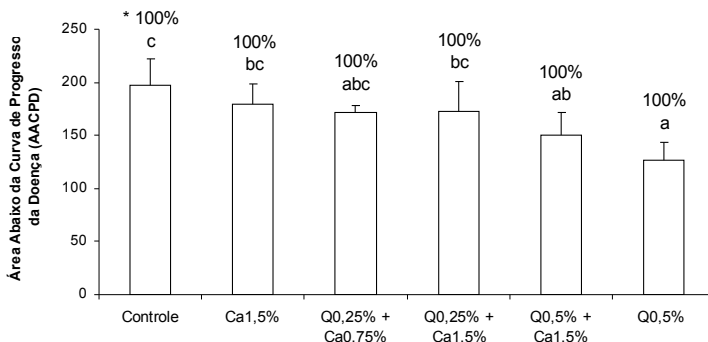


Figura 7 – Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em solução de cloreto de cálcio (Ca) a 1,5% (m/v), em suspensão de quitosana (Q) a 0,25% ou 0,5% (m/v) ou em misturas contendo cloreto e quitosana, para o controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.

Com a adição do cloreto de cálcio a 1,5% na suspensão de quitosana a 0,5%, houve uma redução da eficiência antimicrobiana quando comparada com a imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo na concentração de 0,5%. Essa redução verificada com a adição do sal na suspensão chegou próxima a 12%. Embora a imersão de frutos inoculados com *P. expansum* em suspensões de quitosana a 0,5% tenha reduzido a severidade, não foi verificada uma redução do número de frutos sintomáticos neste tratamento (Figura 7).

Quanto à incidência, em todos os frutos, independentemente do tratamento, foram verificados sintomas característicos de *P. expansum*.

2.3.2.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle curativo da podridão de *P. expansum*

No primeiro experimento, a melhor formulação foi obtida pela adição de estearato de magnésio a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,5%, que reduziu a severidade da podridão de *P. expansum* nos frutos inoculados com o fitopatógeno em 37,8%, diferindo estatisticamente dos frutos imersos em água destilada ou na suspensão contendo apenas o polissacarídeo utilizado na mesma concentração (Figura 8). Efeito semelhante não foi verificado com a adição de oleato de sorbitano a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,5%, que obteve uma redução de 31,8% comparada ao controle, porém não diferindo estatisticamente, em termos de severidade, da imersão nas suspensões contendo apenas o polissacarídeo nas concentrações de 0,25 ou 0,5%. Já a imersão nas suspensões contendo apenas o polissacarídeo nas concentrações de 0,25 ou 0,5% reduziu a severidade em, respectivamente, 20,1 ou 22,5%. A redução da severidade da podridão em frutos inoculados e imersos em suspensões de quitosana a 0,25% combinadas com estearato a 0,1% ou oleato a 0,1% foi de, respectivamente, 24,6 ou 19,6% quando comparadas ao controle. A incidência de frutos sintomáticos foi de 100% em todos os tratamentos (Figura 8).

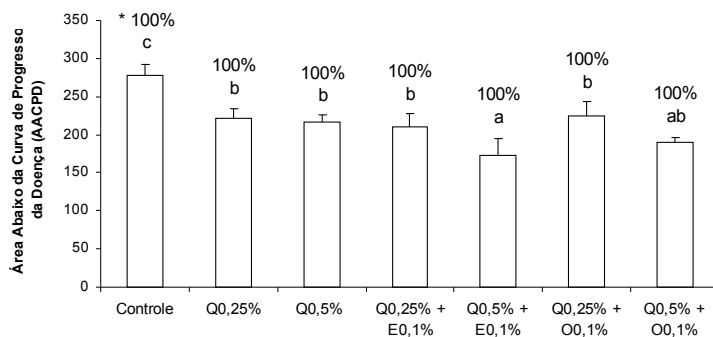


Figura 8 – Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80. Barras

(médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

No segundo experimento, a imersão de frutos em formulações contendo quitosana na concentração de 0,5% mostrou-se mais eficaz em reduzir a severidade da podridão de *Penicillium* em maçãs da cv. Fuji do que as formulações de quitosana a 0,25% (Figura 9). A adição de Tween 80 a 0,1% ou de glicerol a 0,75% na suspensão de quitosana a 0,5% aumentou os níveis de controle do mofo azul, refletindo numa redução da severidade quando comparada à imersão dos frutos em água destilada. Contudo, os dois tratamentos não diferiram estatisticamente, em termos de severidade, da imersão em suspensão contendo apenas quitosana a 0,5%. O nível de controle chegou a 28,4%, quando comparado à testemunha absoluta, na imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,5% com a adição de glicerol a 0,75%, enquanto que na adição de Tween 80 a 0,1% a redução foi de 23,6% (Figura 9).

A imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25% não reduziu significativamente a severidade da podridão. A adição de Tween 80 a 0,1% ou glicerol a 0,75% nessa suspensão não resultou em aumento da sua eficiência antimicrobiana (Figura 9).

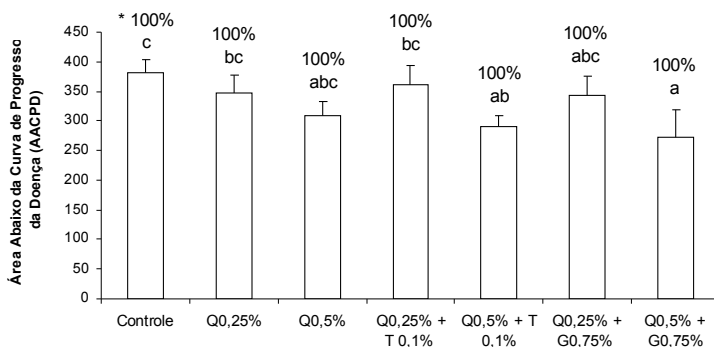


Figura 9 – Efeito curativo da imersão de maçãs cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes Tween 80 (T) ou glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo

teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

No terceiro experimento, a incorporação do glicerol como um adjuvante com propriedades plastificantes à suspensão de quitosana, mostrou-se eficaz em reduzir a severidade da podridão de *Penicillium* em frutos inoculados (Figura 10). Um aumento da eficiência antimicrobiana do revestimento contendo quitosana foi observado quando o glicerol foi adicionado em concentração de 3,0% na suspensão de quitosana a 0,5%, resultando em uma redução da severidade do mofo azul, com um nível de controle de 47,6% se comparado com a imersão em água destilada. A imersão de frutos em suspensões de quitosana a 0,5%, combinada ou não com glicerol a 1,5%, reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 34% ou 31,5%, respectivamente, em relação a testemunha. A adição de glicerol a 3,0% na suspensão de quitosana a 0,25% resultou em um nível de controle numericamente semelhante ao obtido pela imersão em suspensão contendo o polissacarídeo na concentração de 0,5%, com uma redução de 34,8% comparada ao controle (Figura 10).

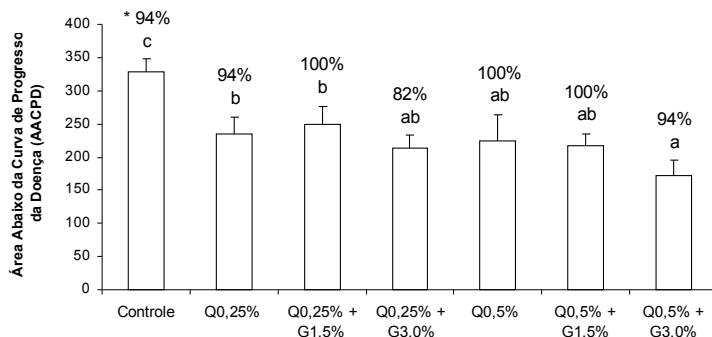


Figura 10 – Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.

No quarto experimento, foi possível verificar que a adição de estearato de magnésio à suspensão de quitosana aumentou a sua eficiência antimicrobiana, sendo que a melhor formulação foi obtida pela adição de glicerol a 0,75%, estearato de magnésio a 0,1% e Tween 80 a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,25%, reduzindo a severidade em 26,5% quando comparada ao controle, tornando-a estatisticamente diferente da testemunha ou da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo (Figura 11). A adição de estearato de magnésio a 0,1% ou a 0,3% na suspensão de quitosana a 0,25% contendo Tween 80 a 0,1% reduziu a severidade, respectivamente, em 24,5% ou 23,8%, indicando que não houve um incremento da atividade antimicrobiana com o aumento da concentração de estearato na suspensão. A imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25% incorporada com glicerol a 0,75% e Tween 80 a 0,1% não diferiu estatisticamente, em termos de severidade, da testemunha ou da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo. Nota-se que o aumento da concentração de estearato (0,3%) na suspensão de quitosana a 0,25%, glicerol 0,75% e Tween a 0,1% acarretou numa perda de eficiência antimicrobiana com uma redução da severidade de apenas 16% comparada ao controle, tornando-a numericamente semelhante, quanto a severidade, à imersão em água destilada ou em suspensão contendo apenas o polissacarídeo na concentração de 0,25% (Figura 11).

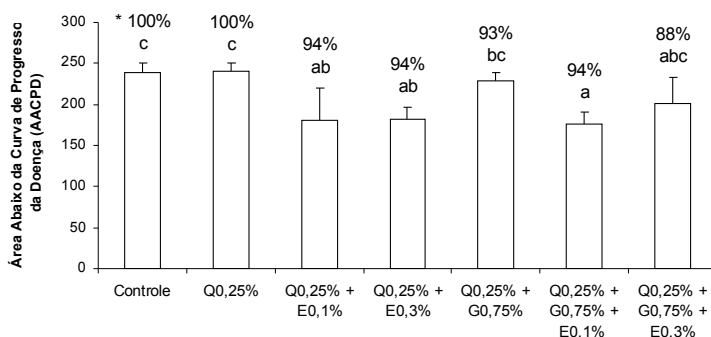


Figura 11 – Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E) ou glicerol (G) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1%

(v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

No quinto experimento, pode-se verificar que a imersão de frutos em suspensão de quitosana a 0,25% não reduziu a severidade da podridão causada por *Penicillium* em maçãs da cv. Fuji, não diferindo estatisticamente da testemunha absoluta (Figura 12). Não foi observado um aumento da eficiência antimicrobiana da suspensão de quitosana a 0,25% com a adição de sorbitol a 0,75 ou a 1,5% na suspensão, sendo que estes tratamentos foram numericamente semelhantes, em termos de severidade, à imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo. No entanto, com a adição de estearato de magnésio a 0,1% e Tween 80 a 0,1% na suspensão de quitosana a 0,25% contendo o sorbitol a 1,5%, houve um incremento da atividade antimicrobiana da suspensão do polissacarídeo, resultando numa redução da severidade (31,4%) quando comparada à testemunha absoluta. A substituição, na formulação, do estearato de magnésio pelo oleato de sorbitano a 0,1% não surtiu o efeito desejado. Conquanto seja estatisticamente diferente da testemunha absoluta, o tratamento contendo oleato não diferiu do tratamento contendo apenas o polissacarídeo. Não houve efeito antimicrobiano das formulações contendo quitosana sobre a incidência da podridão de *P. expansum* nos frutos inoculados, sendo que todos os frutos apresentaram sintomas (Figura 12).

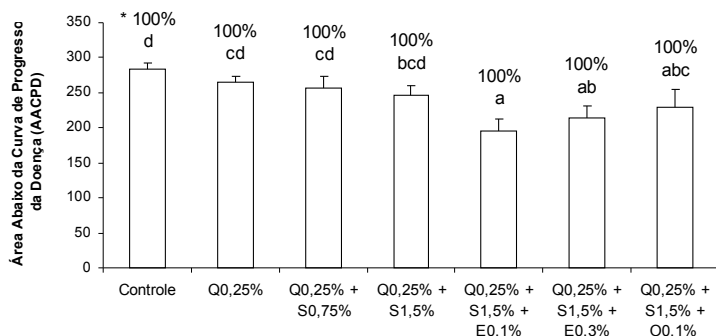


Figura 12 – Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes sorbitol (S), estearato de magnésio (E) e oleato de sorbitano (O) no

controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

O sexto experimento comparou a adição de glicerol ou de sorbitol à formulação contendo quitosana, estearato de magnésio e Tween 80, mostrando que ambas reduziram a severidade da podridão causada por *P. expansum* em maçãs da cv. Fuji inoculadas antes da imersão nos revestimentos se comparadas com a imersão em água destilada ou em suspensão contendo apenas o polissacarídeo e Tween 80 (Figura 13). O tratamento que apresentou maior redução na severidade, quando comparado ao controle, foi a imersão em suspensão de quitosana a 0,25% contendo em sua formulação estearato de magnésio a 0,1%, sorbitol a 1,5% e Tween 80 a 0,1%, o que levou a uma redução da severidade em 23,9%. Uma maior atividade antimicrobiana também foi observada na imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,25% contendo, nas formulações, estearato de magnésio a 0,1%, Tween 80 a 0,1% e glicerol a 0,75 ou a 1,5% que reduziram, respectivamente, em 15,9 e 15,6% a severidade se comparadas ao controle. A imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,25% e Tween 80 a 0,1%, combinadas ou não com estearato de magnésio a 0,1% não reduziram a severidade do mofo azul em maçãs inoculadas. Com um nível intermediário de controle, a imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25% combinada com estearato de magnésio a 0,1%, Tween 80 a 0,1% e sorbitol a 0,75% não se mostrou um tratamento eficiente em reduzir a severidade da podridão, sendo estatisticamente semelhante à imersão em água destilada ou na suspensão contendo apenas o polissacarídeo (Figura 13).

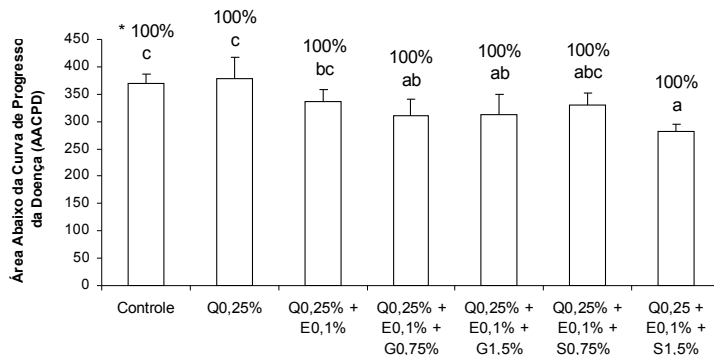


Figura 13 – Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes estearato de magnésio (E), glicerol (G) e sorbitol (S) no controle da podridão de *Penicillium expansum*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Todos os tratamentos receberam a adição de Tween 80 a 0,1% (v/v). Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.3 Efeito protetor do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *B. cinerea*

2.3.3.1 Influência do solvente na eficiência da quitosana para o controle da podridão de *Botrytis*

O tipo de solvente afetou a atividade antifúngica da quitosana contra *B. cinerea*. Conforme a Figura 14, as suspensões de quitosana a 0,5%, obtidas pela dissolução do polissacarídeo em soluções aquosas dos ácidos clorídrico, láctico ou acético a 0,05M (pH 5,6) mostraram-se eficientes em reduzir a severidade da podridão de *Botrytis*, representada pela AACPD, em frutos imersos nos tratamentos e, posteriormente, inoculados com uma suspensão de 10^5 conídios.mL⁻¹.

A imersão dos frutos de macieira em suspensão de quitosana a 0,5% preparada a partir de uma solução de ácido clorídrico, láctico e acético a 0,05 M reduziu a severidade da podridão de *Botrytis* em 85, 98 e 87%, respectivamente, comparada à imersão dos frutos em água

destilada. A severidade da podridão de *Botrytis* nos frutos imersos nas soluções ácidas, sem a presença de quitosana, não diferiu estatisticamente da testemunha (Figura 14).

O efeito protetor conferido ao fruto pelo revestimento com quitosana reduziu também a incidência da podridão de *Botrytis* nos três solventes empregados no preparo da suspensão quando comparado aos tratamentos controle. O solvente que conferiu melhor proteção ao fruto foi o ácido acético com uma incidência de 6,7% de frutos sintomáticos, seguido pelo ácido láctico (25%) e do ácido clorídrico (37,5%). No entanto, foi observado um aumento da severidade da podridão quando os frutos foram imersos em solução de ácido láctico e, posteriormente, inoculados com o fitopatógeno. Por esse motivo, os experimentos subsequentes foram realizados pela dissolução do polissacarídeo em ácido clorídrico.

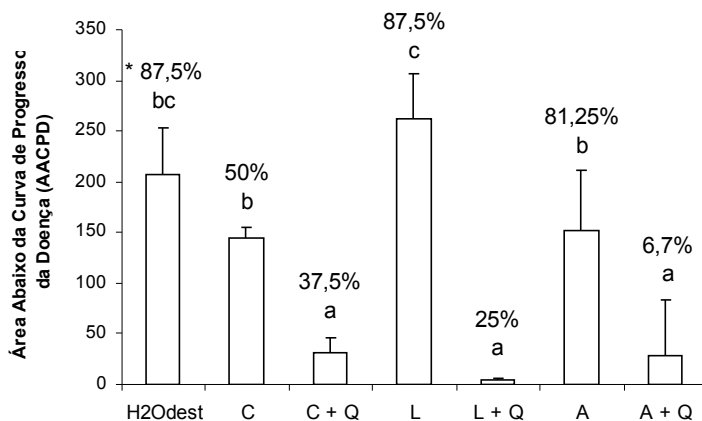


Figura 14 – Influência do solvente da suspensão de quitosana na severidade da podridão de *Botrytis cinerea* em frutos de macieira cv. Fuji, representada pela Área Abaixo da Curva de Progressão da Doença. Os frutos foram imersos em suspensões de quitosana (Q) a 0,5% (m/v) dissolvidas em ácido clorídrico (C), ácido láctico (L) ou ácido acético (A), diluídos a 0,05 M (pH 5,6) e inoculados com *Botrytis cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹). No controle, os frutos foram imersos apenas no solvente (ácido acético, clorídrico ou láctico) ou em água destilada. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pela mesma letra, não diferem entre

si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.3.2 Efeito da incorporação de carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

O efeito da incorporação de carbonato de potássio (K_2CO_3) na suspensão de quitosana pode ser verificado na Figura 15. O tratamento preventivo de frutos de macieira cv. Fuji em solução de carbonato de potássio a 1,5% não reduziu a severidade da podridão de *Botrytis*. A imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,5% combinada ou não com K_2CO_3 a 1,5% reduziu a severidade da podridão em 90,4% e 72,9%, respectivamente, comparada ao controle. No entanto, a imersão dos frutos em suspensão de quitosana com concentração reduzida (0,25%) combinada com K_2CO_3 a 0,75 ou a 1,5% não foi estatisticamente diferente da imersão em água destilada ou em solução de K_2CO_3 a 1,5% (Figura 15).

Quanto à incidência, a imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,5% conferiu uma redução de 50% no número de frutos sintomáticos. Nota-se que embora tenha ocorrido uma redução da severidade da doença, a imersão em suspensões de quitosana a 0,25% adicionadas de K_2CO_3 a 0,75% ou a 1,5% apresentaram uma elevada incidência de frutos que apresentavam sintomas de *Botrytis*, de 73,3% e 80%, respectivamente (Figura 15).

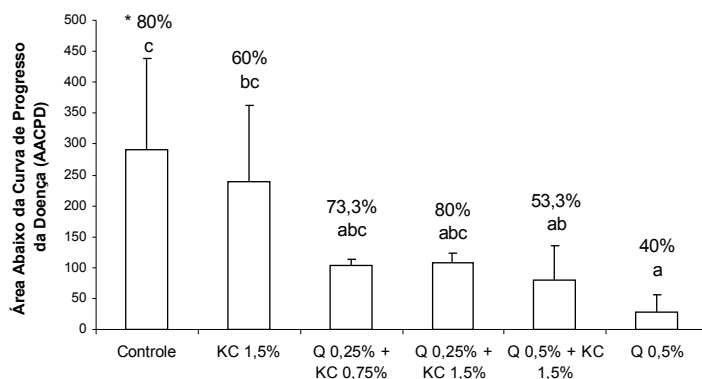


Figura 15 – Efeito preventivo da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensão de quitosana (Q) combinada ou não com carbonato de

potássio (KC) no controle da podridão de *Botrytis cinerea*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.4 Efeito curativo do polissacarídeo quitosana e suas formulações contra a podridão de *B. cinerea*

2.3.4.1 Efeito da incorporação de cloreto de cálcio ou carbonato de potássio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

O tratamento curativo com quitosana a 0,5% conferiu uma redução de 52,5% na severidade da podridão de *Botrytis* comparado ao controle (Figura 16). Houve também uma redução na incidência de frutos que apresentavam sintomas, 65% contra 89,5% na testemunha.

Pela Figura 16, nota-se que houve uma redução na incidência (68,8%) e na severidade com a imersão dos frutos em solução de carbonato de potássio a 2,0%, que foi 51,1% menor quando comparada ao controle. No entanto, a imersão em solução de cloreto de cálcio a 2,0% não apresentou o mesmo efeito inibitório sobre a incidência (81,3%) ou sobre a severidade da podridão de *Botrytis*.

A imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,25% combinadas com concentrações reduzidas de CaCl_2 ou K_2CO_3 (1,0%) não reduziu significativamente a severidade da doença. Ademais, a incidência de frutos sintomáticos foi relativamente alta nos dois tratamentos, ou seja, 73,7% e 78,9%, respectivamente (Figura 16).

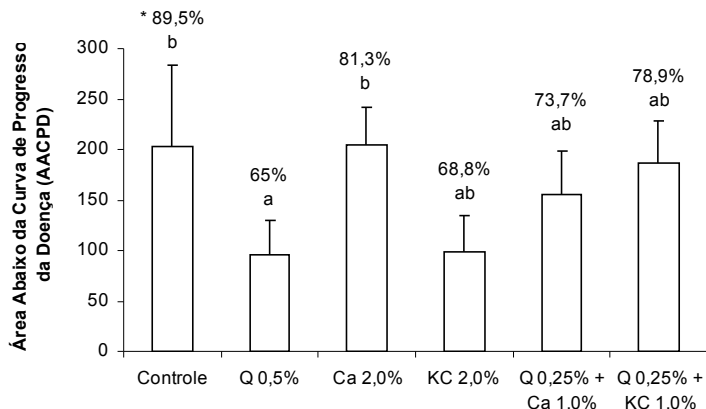


Figura 16 – Efeito curativo da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensão de quitosana (Q) a 0,5% (m/v), dos sais cloreto de cálcio (Ca) a 2,0% (m/v) e carbonato de potássio (KC) a 2,0% (m/v), e da combinação de quitosana a 0,25% com os sais a 1,0% no controle da podridão de *Botrytis cinerea*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.

2.3.4.2 Efeito da incorporação dos adjuvantes glicerol, sorbitol, Tween 80, oleato de sorbitano ou estearato de magnésio à suspensão de quitosana no controle da podridão de *B. cinerea*

Na Figura 17 é possível verificar que a adição de glicerol a 0,75%, estearato de magnésio a 0,1% e Tween 80 a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,25% proporcionou uma redução de 44,6% na severidade de *Botrytis* em frutos inoculados e, posteriormente, tratados por imersão. Embora tenha sido a formulação mais eficiente em reduzir a severidade da podridão de *Botrytis*, diferindo estatisticamente do controle, nota-se que não há uma redução na incidência de sintomas nos frutos. Quanto à adição de glicerol a 0,75% na suspensão de quitosana a 0,25%, foi verificada uma redução de 31,2% na severidade comparada ao controle. Enquanto que a adição de sorbitol a 0,75%, o outro plastificante avaliado, reduziu apenas 28,4% a severidade da podridão de *Botrytis*. Conquanto essas formulações tenham reduzido a severidade, não

diferiram estatisticamente da imersão dos frutos em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,25%.

A imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25% contendo oleato de sorbitano a 0,1% e Tween 80 a 0,1% conferiu uma redução de 34,4% comparada à testemunha, e não diferiu estatisticamente da imersão em suspensões de quitosana combinada com glicerol ou com sorbitol (Figura 17).

Nota-se que a combinação de quitosana a 0,25%, sorbitol a 0,75%, estearato a 0,1% e Tween 80 a 0,1% conferiu uma redução de apenas 19,8% na severidade comparada a testemunha, o que a torna estatisticamente semelhante a imersão em quitosana a 0,25% que reduziu apenas 16,1% a severidade da podridão de *Botrytis*.

Embora tenha ocorrido uma redução na severidade pela imersão de frutos, após a inoculação, em suspensões de quitosana combinadas ou não com adjuvantes, não foi verificada uma redução na incidência de frutos sintomáticos (Figura 17).

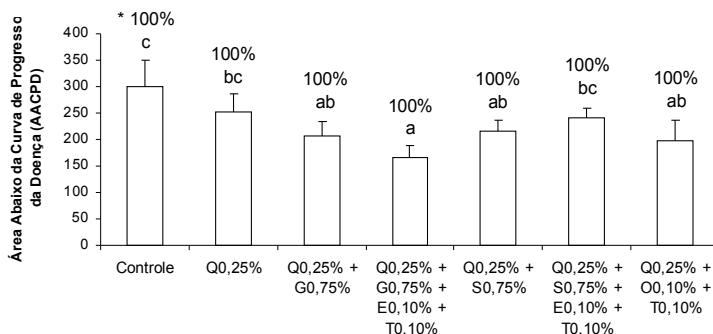


Figura 17 – Efeito curativo da imersão de maçãs da cv. Fuji em suspensões de quitosana (Q) combinadas ou não com os adjuvantes glicerol (G), estearato de magnésio (E), Tween 80 (T), sorbitol (S) e oleato de sorbitano (O) no controle da podridão de *Botrytis cinerea*. A imersão em água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

A Tabela 3 apresenta um resumo dos principais resultados observados nos experimentos conduzidos *in vivo* contra as podridões de *Penicillium* e *Botrytis*. Os valores de redução na severidade assinalados

de 1 a 5 na tabela foram obtidos pela média aritmética das severidades observadas em diferentes experimentos para um mesmo tratamento.

Tabela 3 – Resumo dos principais resultados observados quanto ao efeito da imersão dos frutos de macieira em suspensão de quitosana (Q), contendo ou não adjuvantes Tween 80 (T), sorbitol (S), estearato de magnésio (E), no controle de podridões pós-colheita.

Tratamento	Nível de controle*	Fitopatógeno	Tipo de tratamento
Q0,25%	54% ^[1]	<i>Penicillium</i>	preventivo
Q0,25%	16% ^[2]	<i>Penicillium</i>	curativo
Q0,25% + T0,1% + S1,5% + E0,1%	27% ^[3]	<i>Penicillium</i>	curativo
Q0,50%	27% ^[4]	<i>Penicillium</i>	curativo
Q0,50%	72% ^[5]	<i>Penicillium</i>	preventivo
Q0,25%	16%	<i>Botrytis</i>	curativo
Q0,50%	52%	<i>Botrytis</i>	curativo

^[*] Nível de controle em relação à testemunha absoluta (frutos imersos em água destilada ou HCl 0,05M e pH 5,6).

^[1] Média calculada a partir dos experimentos mostrados nas Figuras 3, 4 e 5; ^[2] nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13; ^[3] nas Figuras 12 e 13; ^[4] nas Figuras 8, 9 e 10; ^[5] nas Figuras 5 e 6.

2.4 Discussão

As formulações contendo quitosana reduziram a severidade das podridões causadas por *P. expansum* e *B. cinerea* em frutos de macieira previamente inoculados (efeito curativo). Em média, quitosana a 0,25% e 0,5% (m/v) diminuiu a severidade das podridões de *Penicillium* em 16% e 27% e de *Botrytis* em 16% e 52%, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Jitareerat et al. (2007), os quais relataram que mangas (*Mangifera indica*), previamente inoculadas com *C. gloeosporioides* apresentaram redução na taxa de progresso da doença após o tratamento com quitosana. Os autores observaram ainda que as concentrações de 0,5 e 1,0% de quitosana aumentaram a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase. Meng et al. (2010) verificaram o efeito de quitosana e oligo-quitosana em peras inoculadas com *Alternaria kikuchiana* ou *Physalospora piricola* e relataram que o efeito de controle sobre as doenças foi dependente da concentração do

polissacarídeo e que a eficiência de controle foi menor com o aumento do tempo entre a inoculação e o tratamento.

Ainda nos experimentos curativos, o revestimento formado pela imersão dos frutos de macieira em suspensões de quitosana ou nas suas formulações pode ter atuado como uma barreira sobre a superfície dos frutos, modificando as trocas gasosas e, conseqüentemente, reduzindo o crescimento dos fitopatógenos. Alguns autores já constataram que os filmes e revestimentos de quitosana apresentam potencial para prolongar o período de armazenamento de frutos e hortaliças devido à redução na taxa respiratória e atraso do amadurecimento devido às reduções na produção de etileno e na evolução do dióxido de carbono (EL GHAOUTH et al., 1991; EL GHAOUTH; ARUL; PONNAMPALAM, 1991).

Por outro lado, nos experimentos em que os frutos foram imersos nas suspensões de quitosana ou nas suas formulações e, posteriormente, inoculados com *P. expansum* ou *B. cinerea* (efeito protetor) foi possível verificar tanto uma redução na severidade quanto na incidência das podridões. Jianming, Hiroshi e Shuichi (1998) demonstraram que o tratamento com suspensão de quitosana a 1,2% inibiu a germinação de conídios e o crescimento da hifa de *B. cinerea* sobre o pericarpo de maçãs da cv. “Jonagold”. Segundo os autores, os frutos revestidos apresentaram menor ocorrência de fissuras ou rachaduras, as quais poderiam tornar o tecido mais suscetível à invasão e colonização pelas hifas do fitopatógeno. El Ghaouth et al. (1991) relataram que a redução da podridão por fungos observada no revestimento de morangos está mais relacionada à atividade fungistática da quitosana do que a capacidade de induzir o sistema de defesa enzimático no fruto. Cuq, Gontard e Guilbert (1995) sugeriram que a quitosana pode atuar como uma barreira física entre os nutrientes contidos no produto e os microrganismos.

Uma das hipóteses mais aceitas relaciona a atividade fungicida e/ou fungistática da quitosana à presença de cargas positivas dos grupos NH_2 protonados que podem interagir com os sítios aniônicos presentes nas proteínas das paredes celulares dos microrganismos-alvo, alterando a sua permeabilidade e possibilitando o extravasamento de constituintes intracelulares (BENHAMOU, 1992).

O aumento da concentração de quitosana de 0,25% para 0,5% na suspensão do revestimento aumentou os níveis de controle, tanto nos experimentos em que os frutos foram imersos nas suspensões antes da inoculação (tratamento preventivo) quanto nos experimentos em que a

imersão ocorreu após a inoculação com os fitopatógenos (tratamento curativo). O revestimento de cenouras (*Daucus carota* L.) com quitosana mostrou-se eficaz na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*, cuja incidência foi significativamente reduzida de 88 para 28% nas raízes revestidas com 2 e 4% (m/v), respectivamente (CHEAH; PAGE e SHEPHERD, 1997). Bhaskara Reddy et al. (2000) verificaram que a pulverização pré-colheita de frutos e plantas de morangueiros com quitosana nas concentrações de 0,2 e 0,6% (m/v) reduziu a incidência de *B. cinerea* em 45 e 62%, respectivamente.

Tendo em vista que a quitosana comporta-se como um polieletrólito na presença de soluções de ácidos, causando o surgimento de interações repulsivas eletrostáticas entre os grupos amino ionizados ao longo da cadeia polimérica, é de importância o emprego de um sistema solvente adequado para se evitar os efeitos iônicos (RINAUDO; MILAS; DUNG, 2003). Além disso, o emprego de um sistema solvente ácido adequado para a obtenção da suspensão de quitosana pode influenciar nas características de viscosidade da suspensão e afetar as propriedades dos filmes e revestimentos resultantes (KIENZLE-STERZER et al., 1982; RHIM et al., 1998; PARK et al., 2002).

Para a obtenção das suspensões do polissacarídeo foram testados diferentes sistemas solventes de ácidos em soluções aquosas. Dentre os solventes utilizados, as suspensões de quitosana dissolvidas nos ácidos clorídrico e láctico foram as que apresentaram maior eficiência na redução da severidade da podridão de *Penicillium* em frutos imersos nos tratamentos e, posteriormente, inoculados com uma suspensão de conídios. El Ghaouth et al. (1992) prepararam suspensões de quitosana a 1,0 e 1,5% (m/v), utilizando-se de solução de ácido clorídrico a 0,25 M e pH 5,6, para controlar *B. cinerea* e *R. stolonifer* em morangos por imersão. Li et al. (2009) verificaram, em testes *in vitro*, que a quitosana dissolvida em ácido láctico exibiu o melhor efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Fusarium sulphureum* quando comparada aos solventes ácidos fórmico e acético. Por ter apresentado resultados favoráveis na redução da incidência e severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira, a dissolução da quitosana em ácido clorídrico a 0,05 M foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

O efeito sinérgico obtido quando dois ou mais compostos são utilizados em combinações, têm sido explorado e amplamente relatado por aumentar a eficiência e o potencial de controle antimicrobiano de compostos químicos e/ou biológicos, quando comparado ao emprego destes compostos de forma individual.

Visando aumentar a eficiência antimicrobiana da quitosana para o controle das podridões de *Penicillium* e *Botrytis* em frutos de macieira, foram testados nos experimentos a adição de cloreto de cálcio, glicerol, sorbitol, Tween 80, estearato de magnésio e oleato de sorbitano, entre outros adjuvantes na suspensão final do polissacarídeo.

O emprego de sais orgânicos ou inorgânicos, muitos dos quais são utilizados no processo produtivo de alimentos como conservantes, para o controle de podridões pós-colheita têm sido relatado (SMILANICK et al., 1997; SMILANICK et al. 1999). De acordo com Smilanick et al. (1999), geralmente, são utilizados por imersão dos frutos na solução ou aplicados juntamente à cera de recobrimento dos frutos.

Conway et al. (1988, 1992) e Sharples e Johnson (1977) atribuem à aplicação de sais de cálcio em frutos em pós-colheita um importante papel na redução de desordens fisiológicas, na prolongação da vida de prateleira e na inibição de podridões pós-colheita. Segundo Garcia et al. (1996), os íons de cálcio formam pontes ou ligações cruzadas entre os grupos carboxílicos livres da cadeia de pectina presentes na parede celular. Bakshi et al. (2005) atribuíram o aumento da integridade estrutural da parede celular aos complexos formados entre o cálcio e os resíduos de ácido poligalacturônico da lamela média, que podem reduzir também a eficiência das enzimas pectinolíticas produzidas pelo patógeno em degradar a parede celular.

No entanto, a imersão dos frutos de macieira da cv. Fuji inoculados com *P. expansum* em solução de cloreto de cálcio a 1,5% (m/v) não surtiu o efeito desejado (Figura 7). Não foi observada redução da severidade da podridão, representada pela AACPD, quando os frutos foram imersos na solução de cloreto de cálcio na concentração de 1,5%. A adição de um adjuvante (surfactante) à solução poderia aumentar o seu efeito antimicrobiano contra o fitopatógeno, conforme verificado por Alvindia e Natsuaki (2007). Esses autores observaram que a adição do surfactante APSA-80TM aumentou o efeito fungistático dos sais de carbonato e bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio contra a podridão da coroa em banana, além de aumentar a aderência e de tornar a distribuição mais uniforme na superfície tratada e de evitar a cristalização sob a superfície dos frutos.

Verificou-se que a adição do cloreto de cálcio (CaCl_2) à suspensão de quitosana diminuiu a atividade antimicrobiana da suspensão. A severidade da podridão de *Penicillium* foi reduzida em 36% na imersão dos frutos de macieira em suspensão de quitosana a

0,5%, enquanto que a adição de cloreto de cálcio a 1,5% nessa suspensão reduziu em apenas 24% a severidade (Figura 8). Chen, Yeh e Chiang (1996) atribuíram a menor eficiência antimicrobiana de filmes de quitosana contra *P. notatum* e *Rhodotorula rubra*, quando sorbato de potássio foi adicionado ao filme baseado em quitosana-metilcelulose por estarem ocorrendo interações entre os grupos carboxilatos do sorbato de potássio e as cargas positivas dos grupamentos amino protonados da quitosana.

Segundo Devlieghere, Vermeulen e Debevere (2004), a adição de cloreto de sódio à suspensão de quitosana a 0,01% em meio de cultivo Sabouraud, diminuiu a atividade antimicrobiana da quitosana contra *Candida lambica*, caracterizado por um aumento na taxa de crescimento do microrganismo quando comparado ao crescimento em meio contendo apenas a suspensão do polissacarídeo. A concentração de 1,0% (m/v) de NaCl mostrou-se suficiente para reduzir a atividade antimicrobiana da quitosana no meio. Taha e Swailam (2002) observaram que os íons divalentes, nas concentrações de 10 e 25 mM, reduziram a atividade antimicrobiana da quitosana contra *Aeromonas hydrophila* na seguinte ordem $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. Íons de sódio, nas mesmas concentrações, também reduziram a atividade da quitosana.

Hernández-Muñoz et al. (2006) observaram que a adição de 1,0% de gluconato de cálcio na formulação do revestimento de quitosana (1,5% em ácido acético 0,5%) não prolongou a vida de prateleira de morangos revestidos, porém, aumentou a quantidade de cálcio retida pelo fruto quando comparada à imersão dos frutos em solução contendo apenas o gluconato de cálcio. Park et al. (2005) relataram que a adição de sorbato de potássio a 0,3% à suspensão de quitosana a 2,0% não apresentou vantagem sobre o revestimento formado apenas com o polissacarídeo no controle de *Cladosporium* sp. e *Rhizopus* sp. em morangos revestidos por imersão. No entanto, esses mesmos autores observaram ocorrer uma inibição significativa nos testes *in vitro* quando o sorbato de potássio foi incorporado ao revestimento de quitosana, possibilitando um maior contato do sorbato de potássio com os esporos presentes na superfície de cada placa contendo ágar. Chen et al. (1996) sugeriram que a atividade antimicrobiana de filmes de quitosana, contendo sorbato de potássio, poderia ser reduzida em função da interação iônica entre esses dois componentes.

Além disso, Chardonnet et al. (2000) constataram que o cálcio é necessário em pequenas concentrações para o crescimento micelial de *B. cinerea* por estar envolvido em diversas funções, entre as quais a

síntese de polímeros da parede celular de fungos, migração vesicular e no crescimento apical da hifa (WHITNEY; ARNOTT, 1988). Alguns autores verificaram que a presença de íons Ca^{2+} estimulou a conidiação de culturas submersas de *P. cyclopium* (RONCAL et al., 2002) e *Trichoderma viride* (SIMKOVIC et al., 2008).

Geralmente, a funcionalidade e o desempenho de filmes e revestimentos comestíveis dependerão das propriedades mecânicas e de barreira, as quais irão depender da composição, do processo de formação e do método de aplicação do produto. Segundo Navarro-Tarazaga et al. (2008), as propriedades mecânicas são importantes aos revestimentos por refletirem a capacidade em formar e manter uma camada contínua e homogênea sobre o produto revestido.

Zhang e Quantick (1997) constataram que a adição de 0,1% (v/v) de Tween 80 à suspensão de quitosana proporcionou uma melhor molhabilidade do revestimento. Choi et al. (2002) verificaram que a adição de 1,0% de Tween 80 à suspensão de quitosana a 1,5% melhorou a compatibilidade da suspensão de revestimento com a epiderme de maçãs, reduzindo a tensão superficial do líquido e aumentando assim o coeficiente de espalhamento. Valores ótimos, quanto ao coeficiente de espalhamento, foram obtidos experimentalmente com suspensões contendo quitosana a 1,5% e Tween 80 a 0,1%, para tomate e cenoura (CASARIEGO et al., 2008).

No entanto, a adição apenas de Tween 80 a 0,1% à suspensão de quitosana a 0,25%, tanto nos experimentos preventivos (Figuras 3 e 5), como nos curativos (Figuras 8, 9, 11, 12 e 13), não apresentou resultados satisfatórios na redução da severidade de *Penicillium* em frutos de macieira. Os dados mostraram que a imersão dos frutos, antes ou após a inoculação, em suspensões de quitosana a 0,25% adicionadas de Tween 80 a 0,1% não diferiram estatisticamente, em termos de severidade, da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,25% e/ou na testemunha.

De acordo com Rodríguez et al. (2006), os filmes de amido de batata que continham apenas surfactantes (Tween 20, Span 80 e lecitina de soja) necessitavam da adição de glicerol para manter a sua integridade. Segundo os autores, a fragilidade dos filmes que continham apenas surfactantes em sua formulação, sem glicerol, provavelmente ocorreu devido à falta de fortes interações entre o surfactante e o biopolímero, o que levou a uma separação das fases durante a secagem.

Nesse trabalho, os plastificantes glicerol e sorbitol foram selecionados para comporem as formulações devido aos seus grupos

hidroxila, os quais podem formar pontes de hidrogênio com o polímero quitosana e, consequentemente, aumentar a resistência e a flexibilidade dos revestimentos. Além disso, a seleção de plastificantes pertencentes ao grupo dos polióis leva em consideração a sua compatibilidade com os filmes e revestimentos de quitosana em função da polaridade, da configuração estrutural e do peso molecular (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). A polaridade destes polióis afeta positivamente a sua hidrofilicidade e solubilidade em água, aumentando assim o efeito plastificante. Além disso, os polióis podem atuar como plastificantes por apresentarem baixa volatilidade, bem como não serem tóxicos e não possuírem aroma (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005).

Quanto à geometria e o peso molecular dos plastificantes glicerol e sorbitol, estes polióis apresentam fórmulas estruturais simples, sem grandes ramificações, o que resulta em tamanho pequeno, representados por seus respectivos pesos moleculares (92 e 182 g.mol^{-1}).

A permanência de plastificantes em polímeros é dependente do tamanho da molécula do plastificante e da taxa de difusão no polímero. Além disso, a polaridade e a capacidade de formar pontes de hidrogênio irá influenciar a volatilidade dos plastificantes (PARK et al., 2002). Segundo Mali et al. (2005), o glicerol é tido como um plastificante mais efetivo do que o sorbitol, principalmente por possuir um peso molecular menor do que o do sorbitol, além de apresentar maior hidrofilicidade (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001).

Em dois experimentos preventivos (Figuras 3 e 4), a adição de glicerol a 0,75% à suspensão de quitosana a 0,25% aumentou os níveis de controle da podridão de *Penicillium*, embora estatisticamente semelhantes, em termos de severidade, à imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,25%. No entanto, com a adição de glicerol na suspensão, foi possível verificar uma redução da incidência da podridão quando comparada a imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo (Figura 3). Kim et al. (2006) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) sobre a qualidade interna de ovos revestidos com quitosana a 2,0% (440 kDa). Os autores verificaram que a adição de glicerol a 2,0% nas suspensões de quitosana melhorou o revestimento de ovos proporcionando uma redução significativa na perda de peso e um prolongamento da vida de prateleira por, pelo menos, três semanas a mais em comparação aos ovos não revestidos, durante armazenamento de 5 semanas a 25°C.

O aumento da concentração do plastificante pode melhorar as propriedades dos filmes e revestimentos. A adição de glicerol a 3,0% na suspensão de quitosana a 0,5% reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 47,6% contra 31,5% em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,5% (Figura 10). Enquanto que, no revestimento contendo a metade da concentração de quitosana (0,25%) e glicerol a 3,0%, houve uma redução de 34,8% (Figura 10). Casariego et al. (2008) avaliaram formulações contendo quitosana (1,0; 1,5 ou 2,0%, m/v) combinadas com sorbitol ou glicerol, em concentrações entre 0,25 e 0,50 mL de plastificante por grama de quitosana. No entanto, os autores verificaram que o aumento da concentração de quitosana e dos plastificantes glicerol ou sorbitol na formulação, resultava em decréscimo nos valores de molhabilidade e do coeficiente de adesão em revestimentos de cenoura e tomate.

Quando empregado em filmes e revestimentos em baixas concentrações, os plastificantes podem causar um efeito contrário ao desejado (antiplastificação). Segundo Lourdin et al. (1997), esse efeito ocorre devido às interações entre o plastificante e a matriz polimérica. Zhong e Xia (2008) verificaram que a incorporação de fécula de mandioca, gelatina e glicerol na suspensão de quitosana não afetou negativamente a atividade antifúngica da suspensão contra *Botryodiplodia theobromae* em mangas revestidas, embora tenham ocorrido interações entre os grupos hidroxil da fécula e os grupos amino da gelatina e quitosana. Durango, Soares e Andrade (2006) demonstraram que o revestimento de quitosana, contendo amido e glicerol, foi uma alternativa viável para controlar a microbiota presente em cenouras minimamente processadas, desde o crescimento de bactérias do ácido láctico, coliformes totais, psicrotróficos, leveduras, mofos aeróbios mesofílicos, os quais foram substancialmente inibidos pelo revestimento de quitosana a 1,5%, contendo 4,0% de amido e 2,0% de glicerol. O revestimento contendo apenas amido a 4,0% e glicerol a 2,0% favoreceu o desenvolvimento de organismos mesofílicos e psicrotróficos indicando que estes microrganismos podem ter utilizado o carboidrato como fonte de energia.

A eficiência de controle da suspensão de quitosana foi maior quando empregada de maneira preventiva (tratamento protetor). Em média, quitosana a 0,25% (m/v) diminuiu a severidade da podridão de *Penicillium* em 54% quando utilizada preventivamente, contra 16% de controle médio curativo. Com a imersão dos frutos em suspensão de quitosana previamente à inoculação, ocorre a formação de uma película

protetora, após a evaporação do solvente, que recobre a superfície dos frutos, evitando o contato direto entre o tecido lesionado e os esporos do fitopatógeno. A adição de plastificantes e surfactantes ao revestimento de quitosana não aumentou, de maneira geral, a eficiência do polissacarídeo no controle preventivo de *Penicillium*. O estearato de magnésio, por exemplo, só melhorou a eficiência da quitosana em um dos experimentos preventivos onde foi testado, e apenas quando o estearato foi combinado com o polissacarídeo utilizado na maior concentração, ou seja, 0,5% de quitosana (Figura 6).

Por outro lado, a baixa eficiência da suspensão de quitosana para o controle curativo das podridões pôde ser melhorada com a combinação de adjuvantes no revestimento. Nos testes curativos, uma formulação que se destacou continha quitosana a 0,25%, estearato de magnésio a 0,1%, sorbitol a 1,5% e Tween 80 a 0,1%. Nos dois experimentos curativos onde ela foi empregada contra *Penicillium* (Figuras 12 e 13), a imersão dos frutos inoculados nessa formulação aumentou estatisticamente a eficiência do polissacarídeo quitosana para o controle da podridão. Em alguns experimentos, apenas a adição de estearato de magnésio ao revestimento de quitosana foi suficiente para aumentar o nível de controle exercido pela quitosana (Figuras 8 e 11).

A formulação contendo quitosana (0,25%); Tween 80 (0,1%); glicerol (0,75%) e estearato de magnésio (0,1%) foi efetiva em controlar as podridões de *Penicillium expansum* (Figura 11) e de *Botrytis cinerea* em frutos inoculados (Figura 17), reduzindo a severidade em 26,5% e em 44,6%, respectivamente, comparada a testemunha e diferindo estatisticamente, em termos de severidade, da imersão em suspensão contendo apenas o polissacarídeo.

O estearato de magnésio, que é amplamente empregado na indústria farmacêutica como lubrificante e antiaderente em comprimidos e cápsulas (HOEPFNER et al., 2002), pode estar interagindo com as cargas positivas presentes nos grupamentos amino protonados do polímero de quitosana, melhorando as características antimicrobianas do revestimento. Alguns autores já haviam demonstrado que pode ocorrer interação entre o estearato de magnésio e fármacos, como, naproxeno (BOTHÁ e LÖTTER, 1990), cetoprofeno (MURA et al., 1995) e fosinopril (BALESTRIERI et al., 1996). Nesses casos, os fármacos apresentavam grupamentos -COOH, altamente reativos, os quais foram apontados serem os responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio na interação com o estearato de magnésio.

Entre os plastificantes empregados nos revestimentos, o sorbitol possui maior capacidade de interação com outras moléculas quando comparado ao glicerol, em função do maior número de carbonos. Enquanto o glicerol possui 3 carbonos ligados a 3 hidroxilas, o sorbitol possui 6 carbonos ligados a 6 hidroxilas. Cervera et al. (2004) observaram que os filmes de quitosana plastificados com sorbitol eram muito frágeis e rachavam-se facilmente nos testes de resistência à tração e porcentagem de alongamento na ruptura. Os autores observaram uma maior ocorrência de cristalinidade em filmes de quitosana plastificados com sorbitol, quando comparado ao glicerol (3C) ou ao eritritol (4C). De acordo com os mesmos, a cristalinidade na estrutura de filmes promove as forças intermoleculares, aumentando a rigidez e a fragilidade do filme.

Ziani et al. (2009) verificaram que a eficiência antimicrobiana da quitosana não depende apenas da sua formulação, mas também da espécie de fungo que se deseja controlar e da forma de tratamento (revestimento ou filme). Os autores observaram uma alta atividade antifúngica de filmes e suspensões de quitosana contra *A. alternata*. As suspensões de quitosana apresentaram também uma alta eficiência sobre o crescimento de *R. oryzae*, mas não sobre o de *A. niger*, no qual os filmes apresentaram maior atividade. Quanto aos surfactantes, a adição de Span 80 nas suspensões de quitosana de médio e de baixo peso, ambas na concentração de 3% (m/v), aumentou a atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, enquanto que na adição de Tween 20 a suspensão de quitosana de médio peso a 3%, houve uma perda da eficiência antimicrobiana até mesmo quando comparada a solução contendo apenas o polissacarídeo.

Portanto, a eficiência de controle das podridões causadas por *Penicillium* e *Botrytis* em frutos de macieira é dependente da concentração do polissacarídeo na suspensão de imersão, da forma de imersão (preventiva ou curativa), da resposta do fitopatógeno e da ocorrência de interações entre a quitosana e os adjuvantes adicionados à formulação, bem como a concentração dos adjuvantes na formulação. A partir dos resultados observados, verifica-se que a imersão dos frutos em suspensões de quitosana a 0,25 ou a 0,5%, previamente à inoculação (efeito protetor), reduziu tanto a incidência como a severidade das podridões de *Penicillium* ou *Botrytis*. Não foi observado aumento significativo da eficiência antimicrobiana dos revestimentos de quitosana combinados com os adjuvantes nos experimentos preventivos. Quanto aos testes curativos, uma formulação que se destacou foi aquela

contendo quitosana (0,25%), estearato de magnésio (0,1%), sorbitol (1,5%) e Tween 80 (0,1%), aumentando o nível de controle das podridões em relação à suspensão contendo apenas quitosana.

CAPÍTULO III - Avaliação dos mecanismos de ação da quitosana envolvidos na redução da severidade de podridões em frutos de macieira

3.1 Introdução

A maçã é uma das frutas de maior volume comercializado no país, com uma produção nacional próxima a 1 milhão de toneladas anuais. Um dos principais problemas são as perdas no pós-colheita provocadas por fungos como *P. expansum* e *B. cinerea*, agentes causais do mofo azul e do mofo cinzento, respectivamente.

O controle pós-colheita de doenças em maçãs geralmente é feito com a imersão de frutos em soluções fungicidas e armazenamento em câmaras frigoríficas. No entanto, essas medidas nem sempre são suficientes para reduzir as perdas causadas por esses fitopatógenos.

A possibilidade de se utilizar um composto derivado de um produto de origem natural que apresenta propriedades antimicrobianas no controle de podridões pós-colheita tem despertado o interesse de muitos pesquisadores.

Nesse contexto, a quitosana vem se destacando por possuir baixa toxicidade (DL_{50} : dose letal via oral de 16 g.Kg⁻¹, em camundongos), biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de apresentar efeito fungicida e/ou fungistático ou de atuar como eliciador na indução de mecanismos de defesa em plantas e frutos tratados. Jitareerat et al. (2007) observaram reduções na taxa de progresso da doença após o tratamento com quitosana em mangas inoculadas com *C. gloeosporioides*. Liu et al (2007) verificaram que a incidência da podridão de *Botrytis* e de *Penicillium* em tomates tratados com quitosana a 1,0% foi de 45 e 60%, respectivamente, enquanto que na testemunha a incidência foi de 95 e 100%. Jianming, Hiroshi e Shuichi (1998) observaram, sobre a superfície de frutos de macieira tratados com quitosana a 1,2%, que os conídios de *B. cinerea* exibiram formato anormal, inibição da germinação e redução do crescimento micelial.

Nos experimentos realizados no Laboratório de Fitopatologia/CCA/UFSC, relatados no capítulo anterior, foram observadas reduções de até 79% na severidade da podridão de *Penicillium* pela imersão dos frutos de macieira em suspensão de quitosana a 0,25% adicionada de glicerol a 0,75% previamente à inoculação. Quanto ao efeito curativo, foram observadas reduções de até 34% quando da imersão dos frutos em suspensão de quitosana a 0,25%

combinada com sorbitol a 1,5%, estearato a 0,1% e Tween 80 a 0,1% contra o mesmo fitopatógeno. Tratando-se da imersão dos frutos em suspensão contendo apenas o polissacarídeo a 0,25%, foram observadas reduções de até 54% na severidade em experimento preventivo, contra 16% de controle médio curativo para *P. expansum*.

Para demonstrar o efeito direto da quitosana sobre os fitopatógenos, alguns autores relataram que pode ocorrer uma completa inibição ou mesmo um efeito fungistático quando o polissacarídeo é incorporado ao meio de cultura. Hirano e Nagao (1989) verificaram uma redução superior a 10% no crescimento micelial de *B. cinerea* crescido em meio BDA incorporado com 1 mg.mL⁻¹ de quitosana de alto peso molecular.

El Ghaouth et al. (1992) verificaram que pode ocorrer uma correlação entre a concentração de quitosana no meio e a diminuição do crescimento radial dos fungos *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizopus stolonifer*, sendo que quanto maior a concentração, maior era a inibição.

Estudos recentes têm demonstrado que a quitosana é responsável por alterações morfológicas, estruturais e pela desorganização molecular de células em fungos. El Ghaouth et al. (1992) verificaram que concentrações superiores a 0,15% (m/v) induziram alterações morfológicas em *R. stolonifer*, caracterizadas por excessiva ramificação das hifas. Excessivas ramificações, inchamento e redução do tamanho das hifas são características morfológicas observadas em trabalhos com *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *R. stolonifer* e *Sclerotinia sclerotiorum* tratados com quitosana (BENHAMOU, 1992; EL GHAOUTH et al., 1992a, b; CHEAH; PAGE, 1997).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana pode variar entre 0,0018% a 1,0% para diversos organismos alvos e é influenciada por muitos fatores dentre os quais, o pH do meio de crescimento, o grau de polimerização da quitosana, o grau de acetilação e a presença ou ausência de substâncias interferentes como, por exemplo, proteínas ou lipídeos (ROLLER; COVILL, 1999; RHOADES; ROLLER, 2000). A CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento visível de um microrganismo.

A quitosana a 50 µg mL⁻¹ inibiu a germinação de esporos e reduziu a elongação do tubo germinativo de *B. cinerea* (BEN-SHALOM et al., 2003). Alguns autores relataram ocorrer uma menor esporulação ou mesmo uma completa inibição da esporulação de fungos tratados

com quitosana. A esporulação dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003), *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (BHASKARA REDDY et al., 1998) e *Aspergillus niger* (PLASCENCIA-JATOMEA et al., 2003) foi inibida pelo tratamento com quitosana. Em contraste, outros autores verificaram ocorrer um estímulo da esporulação em *P. digitatum* crescido em meio contendo quitosana (0,5 e 1,5%), que foi significativamente maior do que no controle.

Existem algumas suposições acerca da ação antimicrobiana da quitosana, dentre as quais destaca-se a de que há uma interação entre as moléculas de quitosana carregadas positivamente com sítios aniônicos presentes nas proteínas das paredes celulares dos microrganismos, alterando a sua permeabilidade e possibilitando o extravasamento do conteúdo celular. Tal interação é mediada por forças eletrostáticas entre grupos NH_2 protonados presentes na quitosana e os resíduos negativos nas superfícies celulares.

Sudarshan et al. (1992) e Papineau et al. (1991) relacionaram a aglutinação bacteriana, observada quando estas foram expostas a baixas concentrações de quitosana ($< 0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), com o fato de estar ocorrendo uma interação entre o polímero policatiônico com a superfície bacteriana carregada negativamente.

Liu et al. (2004) observaram, utilizando técnicas de espectrometria e termogravimetria, que houve formação de ligação iônica entre o grupo NH_2 protonado do acetato de quitosana e o grupo fosforila da fosfatidilcolina presente na membrana celular das bactérias estudadas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, alterando a sua integridade e permeabilidade.

Além disso, Cuero et al. (1991) verificaram que a quitosana também atua como um agente quelante, ligando-se a traços de alguns íons metálicos, tornando-os indisponíveis ao crescimento microbiano.

Alguns trabalhos evidenciaram não apenas um efeito fungicida e/ou fungistático, mas também a síntese de fitoalexinas, quitinases, glucanases e outros compostos antimicrobianos relacionados ao sistema de defesa no combate às infecções em plantas tratadas (HIRANO, 1999; BEN-SHALOM, 2002). A aplicação de quitosana e oligômeros de quitina aumentaram a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) e de tirosina amônia-liase (TAL), enzimas-chave da via dos fenilpropanóides, em folhas de soja (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003). Os produtos da FAL e TAL são modificados pela via dos fenilpropanóides para produzirem precursores de metabólitos

secundários, incluindo lignina, flavonóides e fitoalexinas, que desempenham um papel importante nas interações patógeno-hospedeiro (MORRISON; BUXTON, 1993).

Em frutos de citros tratados com quitosana, Rappussi-da-Silva (2006) observou um aumento da atividade das enzimas quitinases, glucanases, peroxidases e polifenoloxidasas, o que pode ter relação com o controle da pinta preta provocada por *Guignardia citricarpa*. De Capdeville et al. (2002) haviam demonstrado que a quitosana pode atuar como eliciadora de respostas de defesa em frutos de macieira. Em frutos de tomateiro, a quitosana reduziu significativamente as podridões causadas por *P. expansum* e *B. cinerea*, aumentando a atividade de peroxidases e de polifenoloxidasas (LIU et al., 2007).

As peroxidases (POX) fazem parte de um grupo de enzimas conhecidas como oxiredutases, promovendo inúmeras reações. Na presença de peróxidos, essas enzimas são capazes de oxidar diferentes compostos, gerando radicais livres. Estão presentes em células animais, vegetais e em microrganismos. Nos tecidos vegetais, encontram-se nas paredes celulares, vacúolos e citoplasma e sua função biológica está relacionada à síntese de fito-hormônios (oxidação do ácido indol-acético), ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, oxidação de fenóis, regulação da elongação de células, maturação e senescência de frutos, síntese de lignina por plantas, defesa contra patógenos e cicatrização de ferimentos (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003)

As POXs apresentam várias funções na defesa celular, pela sua participação na lignificação, suberização e síntese de parede celular, sendo classificadas por Van Loon e Van Strien (1999) como proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) pertencentes à família PR-9. O funcionamento básico das POXs consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxila ligados a um anel aromático (HIRAGA et al., 2001). A reação clássica destas enzimas é a oxidação desidrogenativa do guaiaicol (o-ometoxi-fenol) que resulta na formação de radicais fenoxi, sendo que a subsequente ligação de radicais instáveis leva à polimerização de monômeros e de maneira similar, hidroxicinamil álcool e seus derivativos são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, bem como o ácido hidroxicinâmico, contendo grupos funcionais alifáticos, é convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001).

POXs também oxidam domínios fenólicos de polissacarídeos ferulicolados (polissacarídeo ligado a ácido ferúlico) (FRY, 1986; VANCE et al., 1980) e resíduos de tirosina de proteínas estruturais da parede celular, como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina

(EVERDEEN et al., 1988; BROWNLEADER et al., 1995), formando moléculas maiores e mais complexas, a partir da ligação cruzada dos radicais (HIRAGA et al., 2001). As macromoléculas polimerizadas pelas POXs também são depositadas na superfície extracelular, fortalecendo a parede celular, restringindo a invasão por patógenos e a expansão celular (HIRAGA et al., 2001).

As polifenoloxidasas, por sua vez, promovem a oxidação enzimática de compostos fenólicos produzindo, inicialmente, quinona que rapidamente se condensa, formando pigmentos insolúveis e escuros denominados melanina, ou reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos (ARAÚJO, 1990).

Considerando as reduções significativas na severidade das podridões de *P. expansum* e *B. cinerea* observadas em frutos de macieira imersos nas suspensões de quitosana, o presente trabalho foi conduzido com o intuito de verificar o efeito antifúngico *in vitro* do polissacarídeo sobre os dois fitopatógenos, bem como monitorar a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em frutos inoculados com *P. expansum* e imersos em suspensões de quitosana, visando elucidar o modo de ação do polissacarídeo no controle das podridões em frutos de macieira.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Obtenção das quitosanas e fitopatógenos

Nos testes *in vitro*, dependendo do experimento, foram utilizados até quatro tipos de quitosanas: uma de baixo peso molecular (Qbpm; 50 - 190 kDa) e outra de médio peso molecular (Qmpm; 190 - 310 kDa), ambas adquiridas da Sigma Aldrich Chemicals, SP/Brasil, apresentando 75 – 85% de deacetilação; e duas quitosanas comerciais, uma com 85% de deacetilação (Qcom) e outra com 91% de deacetilação e alta densidade (Qad), ambas gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Luiz Henrique Beirão, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As suspensões de quitosana foram preparadas conforme Bhaskara Reddy et al. (1999), utilizando-se HCl 0,05 M como solvente e ajustando o pH final de cada suspensão para 5,6 com NaOH 2 M.

Os fitopatógenos *P. expansum* Link e *B. cinerea* Pers.:Fr. foram isolados de frutos infectados e cultivados em meio BDA, a $25\pm1^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente e fotoperíodo de 12 h. Frequentemente, os

fitopatógenos foram reisolados de frutos inoculados e sintomáticos para manter a patogenicidade. As suspensões de esporos de *P. expansum* utilizadas nos testes *in vitro* foram obtidas pela retirada de um disco com 10 mm de diâmetro de uma placa contendo cultura com idade de 7 dias, em BDA. Em seguida, o disco foi colocado em bquer contendo 10 mL de suco de maçã a 4% e permaneceu em agitação constante por 5 minutos. A concentração de esporos foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer e a concentração desejada (10^5 conídios.mL⁻¹) foi obtida pela respectiva diluição em suco de maçã a 4%. Já as suspensões de esporos de *B. cinerea* foram obtidas de culturas com duas semanas de idade pela adição de 10 mL água destilada esterilizada na placa e raspagem da colônia com alça de Drigalsky previamente flambada. A suspensão obtida foi filtrada em gaze de camada dupla e a concentração de esporos foi ajustada para 10^5 conídios.mL⁻¹, utilizando água destilada.

3.2.2 Obtenção dos frutos de macieira

Os frutos da cultivar Fuji, classificados como pertencentes à Classe 120 e Categoria CAT1, foram cedidos pela Cooperativa Regional Agropecuária Serrana (Cooperserra), sediada no município de São Joaquim, Santa Catarina.

3.2.3 Atividade antifúngica *in vitro* de quitosana contra *P. expansum*

Alíquotas de 40 µL das suspensões de quitosana comercial (Qcom), nas concentrações finais de 5, 15, 25, 50 µg.mL⁻¹ (1 µg.mL⁻¹ = 0,0001%) foram depositadas nas cavidades de lâminas escavadas, sobre 40 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹). Como controle, foram depositados água destilada e HCl 0,05 M (pH 5,6). As lâminas foram colocadas no interior de placas de Petri, com a realização de câmara úmida. Após 16 horas de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob alta umidade relativa e no escuro, foram adicionados 15 µL de lactofenol em todas as cavidades das lâminas. Em seguida, realizou-se a avaliação em microscópio óptico da porcentagem de germinação de esporos e da mensuração do comprimento do tubo germinativo com o auxílio de uma ocular micrométrica. Para tanto, considerou-se como germinado aquele esporo que apresentava o comprimento de seu tubo germinativo igual ou superior ao diâmetro do esporo. Em cada repetição, foram avaliados 100 esporos quanto à germinação e 30 quanto

ao comprimento do tubo germinativo. O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições por tratamento.

Para avaliar o efeito da quitosana comercial (Qcom) sobre a formação de colônias de *P. expansum*, suspensões de quitosana e o meio de cultura BDA foram autoclavados (120°C; 1 atm por 20') separadamente e combinados, após a autoclavagem, antes de serem vertidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. As concentrações finais do polissacarídeo no meio foram 0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5% (m/v). No controle, foram incorporados ao meio de cultura água destilada ou HCl 0,05 M (pH 5,6), previamente autoclavados. Após a solidificação do meio, foram depositados 100 µL de uma suspensão de esporos de *P. expansum* (10^3 conídios.mL⁻¹) na superfície do meio de cultura e, em seguida, espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski flambada. As placas foram vedadas com filme plástico de policloreto de vinila e incubadas em sala de crescimento a 25±1°C e fotoperíodo de 12 h de luz. O delineamento experimental foi completamente casualizado com cinco repetições por tratamento. Avaliou-se o número de colônias formadas 7 dias após a repicagem.

3.2.4 Avaliação do efeito de cloreto de cálcio, glicerol e Tween 80 sobre a germinação de esporos de *P. expansum*

Para avaliar o efeito de cloreto de cálcio sobre a germinação de esporos de *P. expansum*, alíquotas de 40 µL das soluções diluídas nas concentrações finais de 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0% (m/v) foram depositadas nas cavidades de lâminas escavadas, sobre 40 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹).

Quanto ao efeito do glicerol sobre a germinação de conídios, alíquotas de 40 µL das soluções diluídas de glicerol nas concentrações finais de 0, 0,25, 0,75, 1,5 e 3,0% (v/v) foram depositadas nas cavidades de lâminas escavadas, sobre 40 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹).

Alíquotas de 40 µL das soluções de Tween 80 nas concentrações finais de 0, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,5% (v/v) foram depositadas nas cavidades de lâminas escavadas, sobre 40 µL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios.mL⁻¹).

Nos três experimentos descritos neste item, a testemunha foi representada pela adição de 40 µL de água destilada sobre 40 µL de suspensão de esporos, nas lâminas escavadas. A forma de condução, o delineamento experimental, o tempo de incubação das lâminas e a

avaliação foram realizados de forma semelhante ao descrito no item 3.2.3.

3.2.5 Avaliação da atividade antifúngica da quitosana *in vitro* contra *B. cinerea*

Aliquotas de 40 μL das suspensões de quitosana comercial (Qcom) nas concentrações finais de 50, 150, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ = 0,0001%) foram depositadas nas cavidades de lâminas escavadas sobre 40 μL de suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 conídios. mL^{-1}). A forma de condução do experimento, o delineamento experimental, o tempo de incubação das lâminas e a avaliação foram realizados de forma semelhante ao descrito no item 3.2.3.

Para avaliar o efeito das quitosanas comercial (Qcom), de baixo (Qbpm) e médio (Qmpm) pesos moleculares e de alta densidade (Qad) sobre o crescimento micelial e a esporulação de *B. cinerea*, suspensões de quitosana e o meio de cultura BDA foram autoclavados (120°C; 1 atm por 20') separadamente e combinados, após a autoclavagem, antes de serem vertidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. As concentrações finais do polissacarídeo no meio foram 0, 0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5% (m/v). No controle, foram incorporados ao meio de cultura água destilada ou HCl 0,05 M (pH 5,6), previamente autoclavados. Após a solidificação do meio, um disco de micélio, com 6 mm de diâmetro, proveniente da borda de colônia cultivada em BDA, com uma semana de idade, foi transferido para o centro de cada uma das placas. As placas foram vedadas com filme plástico de policloreto de vinila e incubadas em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h de luz. A avaliação consistiu na mensuração dos diâmetros das colônias em dois eixos perpendiculares entre si utilizando-se de uma régua milimetrada, no momento em que o micélio em um dos tratamentos atingiu a borda da placa. O delineamento experimental foi completamente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo que cada placa correspondeu a uma repetição. Para quantificar a esporulação, suspensões de esporos foram obtidas pela deposição de 10 mL de água destilada em cada uma das placas e pela raspagem da colônia com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente flambada. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze de camada dupla e a concentração de esporos, em cada uma das placas, foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer.

3.3 Efeito da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensões de quitosana combinadas ou não com sorbitol, Tween 80, ou estearato de magnésio sobre a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

Sessenta e cinco frutos de macieira cv. Fuji foram feridos em cinco pontos na região equatorial e inoculados com 15 μL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^5 conídios. mL^{-1}). Após a secagem do inóculo, foram coletados, a partir de 5 frutos, cilindros de 10 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade no local onde foi realizada a inoculação ou em local adjacente à inoculação, distante 5 mm do ferimento. Os frutos restantes foram imersos nas seguintes formulações contendo quitosana comercial (Qcom): I) quitosana a 0,25% (m/v); II) quitosana a 0,25% com Tween 80 a 0,1% (v/v) e sorbitol a 0,75% (m/v); III) quitosana a 0,25% com Tween 80 a 0,1%, sorbitol a 0,75% e estearato de magnésio a 0,1% (m/v) ou IV) solução de HCl 0,05 M (pH 5,6), que se constituiu na testemunha. Logo após a imersão, os frutos de um mesmo tratamento (15 frutos) foram dispostos em 5 bandejas com 3 frutos cada, sob alta umidade relativa, totalizando 20 bandejas. Aleatoriamente, nos intervalos de tempo de 12, 24 e 48 horas após a imersão, foi amostrado um fruto de cada bandeja, totalizando 5 frutos por tratamento e intervalo de tempo. Destes frutos amostrados, foram retirados cilindros no local onde foi realizada a inoculação ou em local adjacente ao local de inoculação. As amostras coletadas foram acondicionadas em papel-alumínio e mantidas sob gelo para, em seguida, serem armazenadas a -20°C até o momento da extração.

As amostras de tecido (1,3 g) de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido usando-se almofariz e pistilo de porcelana (Nalgon, Brasil) até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foram homogeneizadas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-aldrich, USA) 1 mM, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) (Sigma-aldrich, China) 1 mM e polivinil polipirrolidona (PVPP) (Sigma-aldrich, USA) a 1% (m/v), mantido em banho de gelo. O homogeneizado foi transferido para microtubos com capacidade para 2 mL e centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante recolhido foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade de peroxidases nas amostras foi determinada pelo método espectrofotométrico direto no comprimento de onda de 470 nm (comprimento de onda de absorção do tetraguaiacol), conforme a reação

Para se determinar o conteúdo de proteínas totais de cada amostra foi empregado o método de Bradford (1976), que consistiu em adicionar 0,2 mL do reagente concentrado de Bradford a 0,8 mL do extrato protéico. Após 5 min, realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (modelo 700 Plus, Femto, Brasil). A concentração de proteínas totais de cada amostra foi expressa em μg equivalentes de albumina de soro bovino, utilizando-se de curva-padrão de concentrações de albumina de soro bovino variando de 0 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.4 Análise estatística

A análise de variância e o teste de Tukey foram realizados para se verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos pelo software Statistica 6.0 (STATSOFT). A análise de regressão foi requerida para se verificar o efeito das diferentes concentrações de quitosana, cloreto de cálcio, glicerol ou Tween 80 nos testes *in vitro*, utilizando-se como ferramenta o software Sisvar 5.0 (DEX/UFLA).

3.5 Resultados

3.5.1 Avaliação do efeito de quitosana sobre a germinação de esporos e a formação de colônias de *P. expansum*

Quanto ao efeito da quitosana na germinação de esporos de *P. expansum*, é possível verificar na Tabela 4 que houve efeito da concentração de quitosana comercial sobre a germinação do fungo. A porcentagem de inibição foi dependente da concentração do polissacarídeo sendo que o aumento da concentração acarretou em aumento da redução do número de esporos germinados. A concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu a germinação em 57% quando comparada com a testemunha. Quitosana a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu completamente a germinação do fungo após 16 horas de incubação em lâminas escavadas (Tabela 4). Nota-se ainda que houve efeito da concentração de quitosana, sobre o comprimento do tubo germinativo. A concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu em 81% a elongação do tubo (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito de concentrações de quitosana comercial (Qcom) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

Quitosana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$93,5 \pm 4,4^{[1]}$	$367,3 \pm 16,1^{[2]}$
5	$87,5 \pm 5,3$	$294,8 \pm 15,6$
15	$70,8 \pm 5,4$	$180,9 \pm 16,4$
25	$40,3 \pm 4,9$	$70,2 \pm 13,8$
50	0	0

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Houve efeito de concentrações de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. Equações correspondentes ao efeito de quitosana comercial sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 95,04 - 1,94x$ e $R^2 = 0,98$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 0,17x^2 - 15,86x + 370,11$ e $R^2 = 0,99$. Nota: $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ equivale a 0,0001%.

A avaliação do efeito da incorporação de diferentes concentrações de quitosana comercial (Qcom) ao meio de cultura BDA na formação de colônias de *P. expansum* pode ser verificada na Figura 20. Após 7 dias de incubação, observa-se a diminuição do número médio de colônias formadas, sendo que a concentração de 0,5% (m/v) reduziu o número de colônias em torno de 80% quando comparada à testemunha. No entanto, a maior redução relativa ocorreu na concentração de 0,25% que foi de 60% em relação a testemunha. Houve, portanto, um pequeno incremento (20%) do efeito da quitosana sobre a formação de colônias com o aumento da concentração de 0,25% para 0,5% (Figura 20).

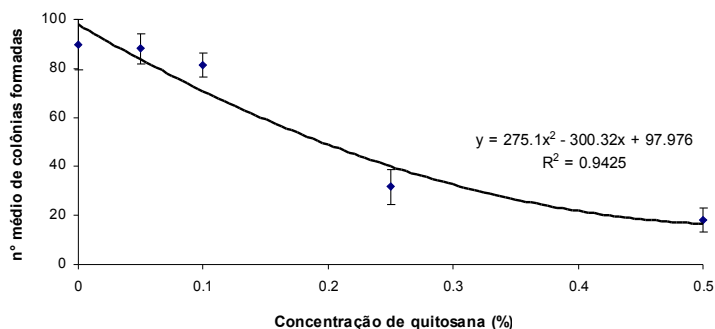


Figura 20 – Efeito de concentrações de quitosana comercial Qcom (0,05; 0,1; 0,25 ou 0,5% - m/v) na formação de colônias de *P. expansum*, 7 dias após a repicagem da suspensão de esporos em BDA. HCl 0,05 M (pH 5.6), incorporado ao meio de cultura, foi utilizado como testemunha. Houve efeito de concentrações de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo pelo teste-t, ao nível de 5% de significância.

3.5.2 Avaliação do efeito de cloreto de cálcio (CaCl_2), glicerol e Tween 80 sobre a germinação de esporos de *P. expansum*

A avaliação do efeito de cloreto de cálcio sobre a germinação de esporos de *P. expansum* mostrou que houve uma diminuição da germinação em função do aumento da concentração do sal no meio (Tabela 5). No entanto, essa redução é pouco expressiva tendo em vista que na maior concentração testada (3,0% m/v) houve uma redução de apenas 12% quando comparada à testemunha.

Quanto ao tubo germinativo, verifica-se que há uma redução do comprimento em função do aumento da concentração do CaCl_2 no meio (Tabela 5). A concentração de 3,0% (m/v) propiciou uma redução de, aproximadamente, 50% no comprimento do tubo germinativo quando comparado ao controle.

Tabela 5 – Efeito de concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

CaCl_2 (%, m/v))	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$93,3 \pm 2,9^{[1]}$	$341,5 \pm 16,1^{[2]}$
0,5	$92,0 \pm 3,7$	$331,1 \pm 24,5$
1,0	$90,3 \pm 5,4$	$305,5 \pm 20,4$
2,0	$86,5 \pm 2,9$	$240,6 \pm 35,2$
3,0	$82,1 \pm 3,2$	$171,4 \pm 30,8$

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Houve efeito de concentrações de cloreto de cálcio sobre a germinação de esporos e sobre o comprimento do tubo pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. Equações correspondentes ao efeito de cloreto de cálcio sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 93,72 - 3,7845x$ e $R^2 = 0,9928$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 354,34 - 58,728x$ e $R^2 = 0,9824$.

Quanto aos adjuvantes, não houve efeito das concentrações testadas de glicerol (Figura 21) e de Tween 80 (Figura 22) contra *P. expansum*, pois não foi possível verificar alterações das características de germinação de esporos e da elongação do tubo germinativo, que aparentemente foram semelhantes ao controle.

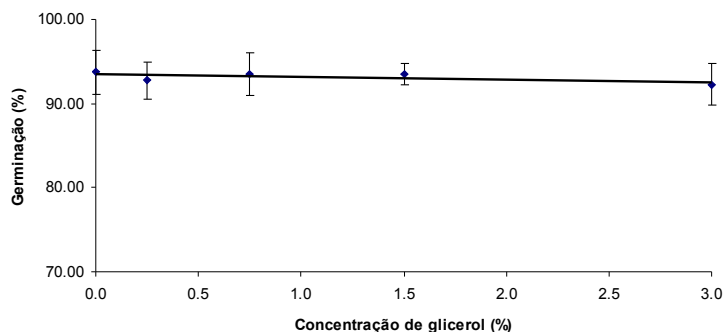


Figura 21 – Efeito de concentrações de glicerol (0, 0,25, 0,75, 1,5 e 3,0%) sobre a germinação de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas. Não houve efeito de concentrações pelo teste F a 5%.

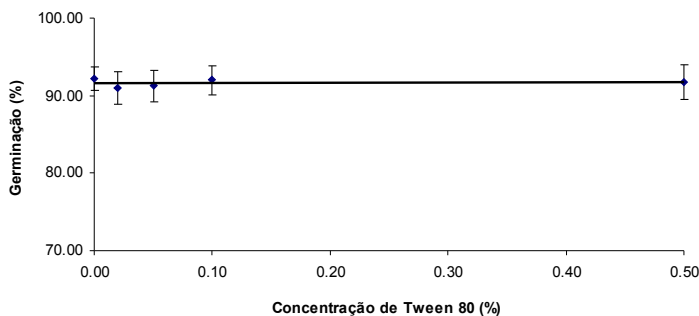


Figura 22 – Efeito de concentrações de Tween 80 (0, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,5%) sobre a germinação de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas. Não houve efeito de concentrações pelo teste F a 5%.

3.5.3 Avaliação da atividade antifúngica da quitosana *in vitro* contra *B. cinerea*

A avaliação do efeito da quitosana comercial (Qcom) sobre a germinação de esporos de *B. cinerea* pode ser verificada na Tabela 6. Houve efeito da concentração de quitosana no meio o que resultou em diminuição da germinação, com o aumento da concentração do polissacarídeo. Na concentração de 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, houve uma redução de, aproximadamente, 81% na germinação do fungo quando comparada à testemunha. Nota-se que houve também influência da quitosana sobre o crescimento do tubo germinativo de *B. cinerea*. Na maior concentração do polissacarídeo houve uma redução de 94% quando comparada à testemunha.

Tabela 6 – Efeito de concentrações de quitosana comercial (Qcom) sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Botrytis cinerea* em lâminas escavadas.

Quitosana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$94,3 \pm 3,3$ ^[1]	$354,7 \pm 16,2$ ^[2]
50	$85,5 \pm 4,5$	$294,8 \pm 15,6$
150	$73,8 \pm 5,3$	$210,9 \pm 14,7$
250	$56,0 \pm 5,4$	$122,6 \pm 12,5$
500	$17,9 \pm 4,8$	$23,0 \pm 10,8$

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *B. cinerea*, respectivamente. Houve efeito de concentrações de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. Equações correspondentes ao efeito de quitosana comercial sobre a germinação de esporos de *B. cinerea*: $y = 94,869 - 0,1585x$ e $R^2 = 0,9986$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 325,38 - 0,6536x$ e $R^2 = 0,9534$. Nota: $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ equivale a 0,0001%.

A avaliação do efeito da incorporação das quitosanas comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm), de médio peso molecular (Qmpm) e de alta densidade (Qad) em meio de cultura BDA sobre o crescimento de *B. cinerea* mostrou que houve uma redução do crescimento micelial com o aumento da concentração do polissacarídeo no meio BDA (Tabela 7). Verificaram-se reduções de 67,8%, 62,4%, 49,2% e 43,5% para Qbpm, Qcom, Qmpm e Qad, respectivamente, na concentração de 0,5% (m/v) quando comparada ao controle.

Tabela 7 – Efeito de diferentes concentrações das quitosanas comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm), médio peso molecular (Qmpm) e de alta densidade (Qad) sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em meio BDA.

Conc. (%, m/v)	Diâmetro médio da colônia (mm)			
	Qbpm	Qcom	Qmpm	Qad
0	$87,6 \pm 2,58$ ⁽¹⁾	$83,0 \pm 9,80$	$80,7 \pm 8,91$	$86,0 \pm 5,48$
0,05	$77,9 \pm 8,06$	$66,8 \pm 12,9$	$75,8 \pm 8,10$	$76,7 \pm 9,44$
0,10	$70,1 \pm 5,89$	$58,5 \pm 5,55$	$67,2 \pm 4,64$	$64,6 \pm 7,15$
0,25	$47,6 \pm 6,06$	$42,0 \pm 8,77$	$44,6 \pm 0,82$	$53,9 \pm 2,16$
0,50	$28,2 \pm 1,64$	$31,2 \pm 4,66$	$41,0 \pm 2,21$	$48,6 \pm 4,08$

⁽¹⁾ Diâmetro \pm desvio padrão.

As equações correspondentes ao efeito da incorporação das quitosanas de baixo peso molecular (Qbpm); comercial (Qcom); médio peso molecular (Qmpm) e alta densidade (Qad) no crescimento micelial de *B. cinerea* são: $y = 83,42 - 117,47x$ e $R^2 = 0,97$; $y = 256,08x^2 - 225,15x + 80,18$ e $R^2 = 0,98$; $y = 242,82x^2 - 206,93x + 83,32$ e $R^2 = 0,98$; $y = 239,74x^2 - 191,73x + 84,89$ e $R^2 = 0,98$; respectivamente. Houve efeito de concentrações de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância.

As quitosanas Qbpm e Qcom também apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* quando as quatro quitosanas foram confrontadas na concentração de 0,1% (m/v) em novo experimento (Figura 23). Neste caso, Qcom e Qbpm reduziram em 43,1% e 46,8%, respectivamente, o crescimento micelial de *B. cinerea*, enquanto as quitosanas Qmpm e Qad não diferiram estatisticamente das duas testemunhas HCl 0,05M (pH 5,6) e H_2O_{dest} (Figura 23).

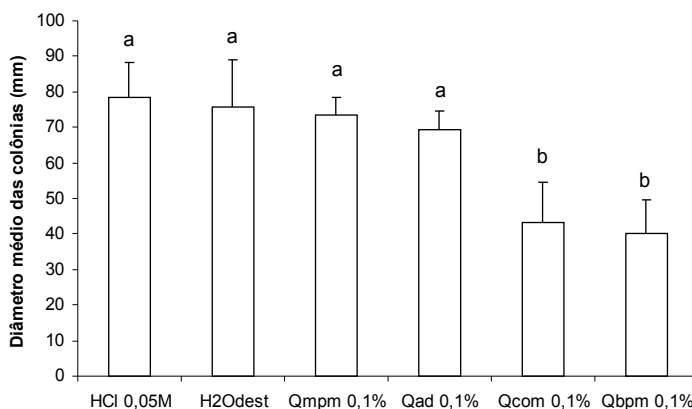


Figura 23 – Efeito da incorporação das quitosanas de médio peso molecular (Qmpm), de alta densidade (Qad), comercial (Qcom) e de baixo peso molecular (Qbpm), na concentração de 0,1% (m/v), em meio de cultura BDA, sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A esporulação do fitopatógeno foi afetada pela incorporação do polissacarídeo em meio BDA. As quitosanas comercial, de baixo peso molecular e de alta densidade estimularam a esporulação de *B. cinerea in vitro* quando incorporadas na concentração de 0,1% (m/v). A maior concentração total de esporos por cm² foi observada na incorporação de quitosana comercial (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação da esporulação média de *Botrytis cinerea in vitro*, em meio de cultura BDA incorporado com as quitosanas comercial (Qcom), de alta densidade (Qad), de médio peso molecular (Qmpm) e de baixo peso molecular (Qbpm) na concentração de 0,1% (m/v).

Tratamento	Concentração de esporos/cm ²	Concentração média de esporos
H ₂ O _{dest}	0	0
HCl 0,05 M (pH 5,6)	102,27	5,00 x 10 ³
Qcom 0,1%	5.564,97	8,55 x 10 ⁴
Qad 0,1%	1.040,95	4,00 x 10 ⁴
Qmpm 0,1%	585,47	2,50 x 10 ⁴
Qbpm 0,1%	1.499,69	2,00 x 10 ⁴

Em novo experimento, observou-se aumento significativo na esporulação do fitopatógeno crescido em meio BDA incorporado com as quitosanas comercial, de baixo peso molecular e de alta densidade, à medida que se elevou a concentração do polissacarídeo (Figura 24). A quitosana de médio peso molecular não afetou a esporulação do fungo. Na concentração de 0,5%, foram observadas concentrações totais de 1.322, 22.167, 35.954 e 47.037 conídios por cm² em quitosana de médio peso molecular, comercial, de baixo peso molecular e de alta densidade, respectivamente (Figura 24).

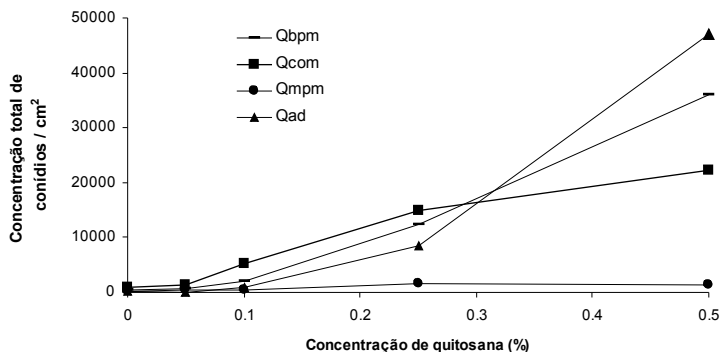


Figura 24 – Efeito de diferentes concentrações das quitosanas de baixo peso molecular (Qbpm), comercial (Qcom), de médio peso molecular (Qmpm) e de alta densidade (Qad) sobre a esporulação de *Botrytis cinerea* em meio BDA.

3.6 Efeito da imersão de frutos de macieira cv. Fuji em suspensões de quitosana combinadas ou não com sorbitol, Tween 80, ou estearato de magnésio sobre a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

A atividade de peroxidases em frutos inoculados com *P. expansum* pode ser verificada na Figura 25. Foram realizadas coletas de amostras de tecidos em quatro tempos diferentes (0, 12, 24 e 48 horas após a imersão) no local inoculado e em local adjacente ao inoculado, distante 5 mm do mesmo. Nota-se que houve diferença estatística nas amostras retiradas 48 horas após a imersão dos frutos, sendo que a atividade de peroxidases em tecido inoculado foi maior do que no tecido adjacente à inoculação, independente do tratamento. Nos demais tempos de amostragem, não houve diferença estatística da atividade de peroxidases entre tecidos inoculados ou não e entre tratamentos.

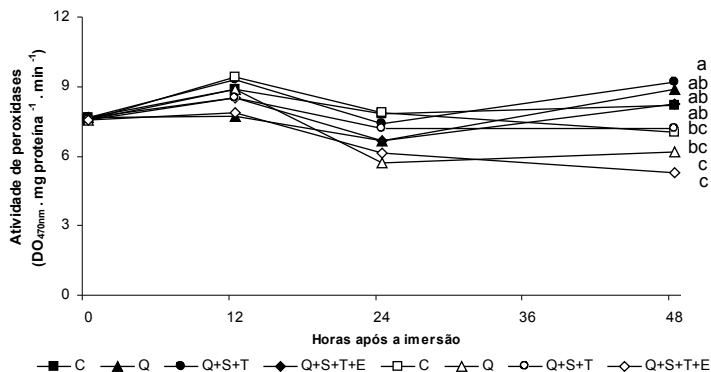


Figura 25 – Atividade de peroxidases em tecidos de maçã retirados no local da inoculação com *P. expansum* (símbolos preenchidos) ou em local próximo à inoculação (símbolos não preenchidos), em frutos de macieira cv. Fuji imersos em formulações de quitosana a 0,25% (Q), combinadas ou não com sorbitol a 0,75% (S), Tween 80 a 0,1% (T) e estearato de magnésio a 0,1% (E). Frutos imersos em HCl 0,05 M (pH 5,6) foram utilizados como controle (C). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto à atividade de polifenoloxidasas, não houve diferença estatística entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo de amostragem ou entre tecidos inoculados e tecidos não inoculados (Figura 26). No entanto, é possível verificar um pequeno aumento na atividade enzimática de polifenoloxidasas em tecidos inoculados coletados 12 horas após a imersão dos frutos, porém que não difere estatisticamente da atividade no tecido não inoculado.

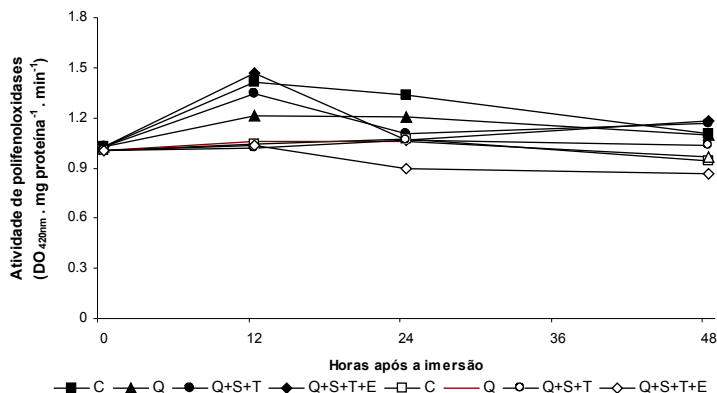


Figura 26 – Atividade de polifenoloxidasas em tecidos retirados no local da inoculação com *P. expansum* (símbolos preenchidos) ou em local próximo à inoculação (símbolos não preenchidos), em frutos de macieira cv. Fuji imersos em formulações de quitosana a 0,25% (Q), combinadas ou não com sorbitol a 0,75% (S), Tween 80 a 0,1% (T) e estearato de magnésio a 0,1% (E). Frutos imersos em HCl 0,05 M (pH 5,6) foram utilizados como controle (C). Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste F a 5% de significância.

3.7 Discussão

O efeito antimicrobiano da quitosana já foi observado em diferentes estágios de desenvolvimento de fungos, ou seja, sobre o crescimento micelial, na esporulação, na viabilidade de esporos e da germinação, na morfologia das hifas e dos esporos. Alguns autores observaram que podem ocorrer mudanças morfológicas no tubo germinativo, como excessivas ramificações, inchamento e redução do comprimento (FELIPINI; DI PIERO, 2009; EL GHOUTH et al., 1992), além de alterações morfológicas a níveis celulares que vão desde alterações estruturais da parede à desintegração total do citoplasma, como resultado do tratamento com quitosana. Bautista-Baños et al. (2003) observaram que a área e a forma elíptica de esporos de *C. gloeosporioides*, crescidos em meio BDA incorporado com 1,5% de quitosana, foram significativamente diferentes do controle.

No presente trabalho, foi possível detectar uma redução do comprimento do tubo germinativo de *P. expansum* e de *B. cinerea* com

o aumento da concentração do polissacarídeo no meio, até mesmo uma completa inibição da germinação de esporos dependendo da concentração utilizada. Os dois fitopatógenos responderam de forma diferente quanto à concentração de quitosana necessária para causar algum efeito antifúngico sobre a fase de germinação de esporos. Enquanto que para *P. expansum*, a concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu completamente a germinação, somente na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi possível verificar uma redução drástica na germinação de esporos de *B. cinerea*. El Ghaouth et al. (1992) relataram que concentrações a partir de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de quitosana incorporada ao meio de cultura reduziram a viabilidade de esporos e o crescimento do tubo germinativo dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

Meng et al. (2010) conduziram testes de germinação de conídios de *Alternaria kikuchiana* e *Physalospora piricola* em meio BDA ou BSA (batata, sacarose, ágar). Os autores relataram que podia ocorrer uma diferença na eficiência antifúngica da quitosana dependendo do estágio de desenvolvimento em que se encontrara o patógeno, sendo que os mesmos observaram que ocorria um maior efeito do tratamento com quitosana e oligo-quitosana sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos do que sobre a germinação de conídios.

Ainda nos testes *in vitro*, foi possível verificar uma redução no número de colônias de *P. expansum* formadas com o aumento da concentração de quitosana incorporada no meio de cultura BDA, indicando que pode ocorrer uma completa inibição da germinação e até mesmo do crescimento da colônia. Liu et al (2007) observaram uma redução da germinação de conídios de *P. expansum* em placas de Petri contendo BDA incorporado com quitosana em todas as concentrações testadas (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0%), com uma completa inibição a partir de 0,5%, após 12 horas de incubação a 25°C . Porém, estes autores avaliaram o efeito do polissacarídeo sobre a germinação de conídios em período de incubação de apenas 12 horas, enquanto neste trabalho o efeito foi avaliado até 7 dias após a repicagem e incubação, indicando que pode ter ocorrido efeito inicial fungistático sobre o patógeno nas primeiras horas, na concentração de 0,5%.

No presente estudo foram testadas também quitosanas com diferentes pesos moleculares e seu efeito *in vitro* sobre o crescimento micelial de *B. cinerea*. Os resultados demonstraram que as quitosanas de baixo peso molecular (Qbpm) e a comercial (Qcom) (Figura 23) apresentaram maior efeito inibitório, reduzindo o crescimento micelial do fitopatógeno *in vitro*. Este fato corrobora o resultado observado por

Hernández-Lauzardo et al. (2008), os quais relataram que a quitosana de baixo peso molecular ($1,74 \times 10^4$ g/mol) foi mais eficiente em reduzir o crescimento micelial de *R. stolonifer*. Badawy e Rabea (2009) verificaram ocorrer um aumento da atividade antifúngica da quitosana sobre *B. cinerea* isolado de tomate com a diminuição do peso molecular do polissacarídeo. Liu et al. (2007) observaram um maior efeito de quitosanas de baixo peso molecular sobre *B. cinerea* e *P. expansum*. Hirano e Nagao (1989) verificaram uma inibição no crescimento micelial de 18 espécies diferentes de fungos pela presença de quitosana, e que este efeito foi dependente do grau de polimerização da quitosana e também da espécie de fitopatógeno.

A hipótese mais aceita para o maior efeito antimicrobiano das quitosanas de baixo peso molecular resulta do fato de que os biopolímeros menores conseguem atravessar com maior facilidade a membrana plasmática dos microrganismos causando desorganização a nível celular (ZHENG; ZHU, 2003). Um aumento do peso molecular do polímero se traduz em diminuição da permeação no núcleo da célula. Segundo Chen e Hwa (1996), as quitosanas de baixo peso molecular apresentam maior permeabilidade do que as quitosanas de alto peso molecular. Muzarelli e Muzarelli (2002) observaram que quitosanas de baixo peso molecular (5 a 20 kDa) apresentaram maior atividade biológica quando comparada a quitosana de alto peso molecular. Além disso, foi observado que quitosanas de baixo peso molecular foram mais eficientes na indução de resistência a doenças (VASYUKOVA et al., 2001) e apresentaram efeito promissor quando aplicada na pós-colheita de tangerinas, retardando a perda peso e o aparecimento de podridões (CHIEN et al., 2007).

O tempo de incubação dos esporos em contato com a suspensão de quitosana também pode influenciar na atividade antifúngica. Liu et al. (2007) demonstraram que a integridade da membrana dos esporos de *P. expansum* e *B. cinerea* foi afetada pelo tempo de incubação em Caldo-Batata-Dextrose contendo 0,5% de quitosana. A membrana plasmática de *P. expansum* foi mais sensível à quitosana quando comparada a de *B. cinerea*. Os autores verificaram que a integridade da membrana, após duas horas de incubação, foi de 48,2% para *P. expansum* e de 82,5% para *B. cinerea*.

A esporulação de *B. cinerea* *in vitro*, também foi afetada pela incorporação do polissacarídeo no meio de cultura BDA. O aumento da concentração de quitosana no meio, além de reduzir o crescimento micelial, estimulou a esporulação do fitopatógeno. Foi possível verificar

também que a esporulação foi influenciada pelo tipo de quitosana, sendo que as incorporações das quitosanas de baixo peso molecular (Qbpm) e comercial (Qcom) foram os tratamentos que mais estimularam o fungo quanto à esporulação. Um estímulo à esporulação foi observado quando *P. digitatum* foi colocado para crescer em meio contendo quitosana nas concentrações de 0,5 e 1,5% (BAUTISTA-BAÑOS; LÓPEZ; MOLINA, 2004). Bhaskara Reddy et al. (1998) já havia reportado resultado semelhante para *A. alternata* f. sp. *lycopersici* em doses sub-letais de quitosana (100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes autores relacionaram a maior esporulação observada a uma resposta ao estresse induzido pelo polissacarídeo. Quanto à redução do crescimento micelial, este fato corrobora os resultados observados por El Ghaouth et al. (1992), que observaram ocorrer uma correlação entre a concentração de quitosana no meio e a diminuição do crescimento radial dos fungos *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizopus stolonifer*, sendo que quanto maior a concentração maior foi a inibição.

In vitro, glicerol e Tween 80 não apresentaram efeito inibitório na germinação de esporos e na elongação do tubo germinativo de *P. expansum*. Franco e Bettiol (2002) verificaram que o uso de Tween 80 a 1,7% não inibiu a germinação de esporos de *P. digitatum*, assim como não reduziu a incidência e a severidade da podridão em frutos de citros. Quanto ao cloreto de cálcio, foi possível verificar uma redução pouco expressiva no número de esporos germinados com o aumento da concentração do sal, porém este fato pode ser devido à elevada pressão osmótica do que a algum efeito fungicida.

Esses resultados *in vitro* sobre *P. expansum* e *B. cinerea*, agentes causais de podridões em maçãs, reforçam a hipótese de que a redução na severidade observada nos frutos tratados com quitosana se deve principalmente ao efeito antifúngico do polissacarídeo e que os adjuvantes, glicerol e Tween 80, melhoraram as propriedades físicas dos revestimentos sem causar efeito deletério direto sobre o fitopatógeno. Esse fato corrobora o observado por Ziani et al. (2009), os quais testaram suspensões de quitosana combinadas com os surfactantes Tween 20 ou Span 80 contra *Alternaria alternata* e verificaram que a adição dos surfactantes não proporcionou aumento da atividade antifúngica *in vitro* das suspensões comparadas à suspensão contendo apenas o polissacarídeo.

Com relação às enzimas avaliadas, a imersão dos frutos inoculados com *Penicillium* em suspensão de quitosana, contendo ou não adjuvantes, não alterou a atividade de peroxidases ou de

polifenoloxidasas até 48 horas após os tratamentos. Por outro lado, a atividade de peroxidases aumentou significativamente no tecido ferido e inoculado em relação ao tecido adjacente (sem ferimento e não inoculado), no tempo de 48 h após os tratamentos. O aumento na atividade de peroxidases em tecidos feridos pode ser um indicativo da ocorrência de oxidação de compostos fenólicos e da biossíntese de lignina, que atua como uma barreira à infecção microbiana (MARRIOTT; BEEN; PERKINS, 1978). Wang, Feng e Chen (2009) demonstraram que os tratamentos com oligossacarídeos de quitosana, “Burdock fructooligosaccharide” (BFO) e a inoculação com *B. cinerea* aumentaram a atividade de peroxidases em frutos de tomate, atingindo valores 1,4, 1,43 e 1,26 vezes maiores do que na testemunha (água), 3 dias após os tratamentos, respectivamente. Meng et al. (2010) verificaram aumento na atividade de peroxidases do tecido retirado ao redor de lesões tratadas com quitosana apenas 48 horas após o tratamento. Nas primeiras 24 horas, não houve diferença estatística entre a deposição de água, oligo-quitosana ou quitosana no ferimento quanto à atividade de peroxidases, embora tenha ocorrido aumento da atividade em todos os tratamentos.

Diferentemente do observado pelos autores citados anteriormente, Dong et al. (2004) relataram que pode ocorrer redução na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em frutos de lichia descascados e revestidos com quitosana, após 6 dias de armazenamento a -1°C . Zhang e Quantick (1997) relataram que o revestimento de quitosana, independentemente da concentração (1 ou 2%), atrasou o aumento da atividade da enzima polifenoloxidase e, parcialmente, o aumento da atividade da peroxidase em lichia. Felipini e Di Piero (2009) observaram maior atividade de peroxidases em tecidos feridos, tratados ou não com quitosana, do que em tecidos inoculados com *C. acutatum* em frutos de macieira.

Badawy e Rabea (2009) demonstraram que a deposição de $20\text{ }\mu\text{L}$ de quitosana sobre os ferimentos de frutos de tomate reduziu a atividade de polifenoloxidasas. Os autores verificaram que a atividade da polifenoloxidase foi influenciada pela concentração do polissacarídeo e pelo peso molecular, sendo que a quitosana com peso molecular de $5,7 \times 10^4$ (g/mol), na concentração de 4000 mg/mL , foi mais eficiente em reduzir a atividade da enzima polifenoloxidase. Segundo os autores, a presença de cargas positivas no polímero de quitosana pode tornar indisponível, por quelação, íons metálicos, como o cobre e o ferro, que são encontrados nos sítios ativos desta enzima, inativando-a.

Jiang e Li (2001) verificaram que o revestimento de frutos de longan (*Dimocarpus longan* Lour) com quitosana reduziu a taxa respiratória e a atividade de polifenoloxidasas. Segundo os autores, um aumento na taxa respiratória de frutos durante o armazenamento prolongado pode ser um indicativo de desenvolvimento de patógenos pós-colheita.

Pelos resultados obtidos, sugere-se que a redução da incidência e severidade das podridões pós-colheita de *Penicillium* e *Botrytis* em frutos de macieira pela quitosana comercial ocorreu em função da elevada atividade antibiótica do polissacarídeo.

CAPÍTULO IV - Avaliação do efeito da fumigação de compostos voláteis no controle da podridão de *Penicillium expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

4.1 Introdução

As perdas pós-colheita em maçãs geralmente são decorrentes de podridões causadas principalmente pelos fungos *Penicillium expansum* Link (mofo azul), *Botrytis cinerea* (mofo cinzento), *Botryosphaeria dothidea* (podridão branca) e *Glomerella cingulata* (podridão amarga), que podem acometer os frutos durante o transporte, no armazenamento ou nos entrepostos e mercados.

Os propágulos de fungos podem ser facilmente encontrados aderidos aos bins de madeira, em restos culturais, solo e folhas que acompanham os frutos. Blanpied e Purnasiri (1968) verificaram que a água empregada nas operações de transporte de frutos para a mesa classificadora em *packing houses* apresentava concentrações que variavam de 1.000 a 7.000 esporos germinados de *P. expansum* por mL de água. Sholberg e Owen (1990) observaram que a concentração de propágulos de *Penicillium* spp. na água do tanque de imersão dos bins variava em função da cultivar, sendo que a água do tanque de imersão dos frutos da cv. McIntosh continha 15.555 propágulos.mL⁻¹ enquanto que para as cv. Spartan e Golden Delicious foram observados 5.000 e 2.000 propágulos.mL⁻¹, respectivamente, após a imersão de 650 bins.

Para agravar a situação, relatos indicaram a ocorrência de resistência, vários anos após a introdução dos fungicidas benzimidazóis, de isolados de *P. expansum* a esse grupo químico. A resistência se espalha rapidamente devido à intensa pressão de seleção causada por resíduos de fungicidas em frutos tratados (VINAS; USALL; SANCHIS, 1991).

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente da comunidade científica e dos órgãos ligados às áreas da saúde, do meio ambiente e da agricultura no sentido de encontrar alternativas ao uso de agrotóxicos no período pós-colheita. Entre elas, torna-se promissor o emprego de compostos naturais com características voláteis e propriedades antimicrobianas já que estes poderiam ser empregados durante diversas etapas ao longo da cadeia produtiva sem a necessidade do uso de uma tecnologia específica que inviabilize a sua aplicação, por exemplo, durante o transporte e o armazenamento em câmaras frigoríficas nos *packing houses* ou nos locais de comercialização.

As frutas e os legumes apresentam naturalmente um número enorme de compostos voláteis, aromáticos e de sabor que podem ser explorados devido às suas propriedades antimicrobianas. Esses compostos são metabólitos secundários e, geralmente, são produzidos pelos frutos durante a fase de amadurecimento, podendo conferir resistência aos frutos na fase pós-colheita. Wilson et al. (1987), por exemplo, constataram que os pêssegos produzem um número relativamente considerável de compostos voláteis com atividade fungicida. Dentre os quais, o acetaldeído vem sendo explorado para controlar *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* em uva de mesa (AVISSAR; PESIS, 1991) e *Penicillium* spp. (STADELBACHER; PRASAD, 1974).

Alguns ácidos orgânicos têm sido tradicionalmente utilizados como acidulantes, realçadores de sabor ou conservantes na industrialização de alimentos destinados ao consumo humano (BRUL; COOTE, 1999) e também vêm sendo incorporados à ração na alimentação de aves para controlar fungos e outros microrganismos (PASTER et al., 1987).

Muitos destes ácidos são classificados como GRAS (*Generally recognized as safe*), geralmente reconhecidos como seguros à saúde e ao ambiente pela Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA - *Food and Drug Administration*). Os ácidos acético, cítrico e tartárico, por exemplo, apresentam propriedades antifúngicas (BARBOSA-CANOVAS et al., 1998), são inibidores da oxidação lipídica, impedindo o escurecimento em produtos alimentícios e ainda atuam como agentes quelantes (DOORES, 1993).

Os trabalhos mostram que ácidos orgânicos de cadeia curta podem afetar a membrana celular de microrganismos, interferindo no transporte de metabólitos e na manutenção do potencial de membrana (FREESE et al., 1973). Supõe-se que o efeito inibitório é devido à condução de prótons através da membrana, destruindo a força próton-motriz que é necessária para o transporte do substrato (FREESE; LEVIN, 1978).

Os ácidos acético, fórmico e propanóico apresentam pontos de fusão de 16, 8 e -24°C, pontos de ebulição de 118, 100 e 141°C e pressões de vapor de 11,8, 35,0 e 2,4 mmHg a 20°C, respectivamente, o que os tornam líquidos relativamente voláteis em condições ambiente, podendo ser utilizados no controle de podridões em pós-colheita através da fumigação. Estudos têm relatado o efeito do ácido acético na prevenção das podridões pós-colheita causadas por *P. digitatum*, *B. cinerea*, *P. expansum*, *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer* em

fruteiras de caroço (SHOLBERG; GAUNCE, 1996), em uvas de mesa (SHOLBERG et al., 1996), em laranjas, limões e toranjas (SHOLBERG et al., 1998), em maçã (SHOLBERG et al., 2001), em damascos e ameixas (LIU et al., 2002) e em pêra (SHOLBERG et al., 2004), entre outros

O ácido fórmico, por exemplo, é o primeiro e mais forte da série de ácidos carboxílicos ($pK_a = 3,75$). Ocorre naturalmente em uma variedade de plantas e frutos, tecidos de mamíferos e no veneno de insetos. Pode ser encontrado no corpo humano, como um metabólito, em baixas concentrações. No entanto, é tóxico quando acumulado na forma livre, por contato ou inalação.

O hexanal, por sua vez, é um aldeído de seis carbonos que pode ser encontrado naturalmente, na forma de compostos voláteis, e de forma abundante em tecidos vegetais. Alguns trabalhos demonstraram o efeito deste composto na germinação de esporos e no crescimento micelial de *B. cinerea* (FALLIK et al., 1998), *Colletotrichum gloeosporioides* (VAUGHN; SPENCER; SHASHA, 1993) e *P. expansum* (NERI; MARI; BRIGATI, 2006).

Até mesmo o etanol vem sendo pesquisado para o controle de podridões em pós-colheita. Chervin et al. (2005) constataram que a fumigação de uvas com etanol por duas horas foi tão eficiente quanto o SO_2 no controle de *B. cinerea*. Chen et al. (2007) relataram que o vapor de etanol reduziu significativamente as podridões causadas por *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp em *Myrica rubra*.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fumigação dos ácidos fórmico, acético e propanóico, e também de hexanal e etanol sobre a germinação *in vitro* de esporos de *P. expansum* e no controle da podridão de mofo azul em frutos de macieira cv. Fuji.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Obtenção dos frutos de macieira, reagentes e fitopatógeno

Os frutos da cultivar Fuji, classificados como pertencentes à Classe 120 e Categoria CAT1, foram cedidos pela Cooperativa Regional Agropecuária Serrana (Cooperserra), sediada no município de São Joaquim, Santa Catarina.

O fitopatógeno *Penicillium expansum* Link foi isolado de fruto infectado e cultivado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a $25 \pm 1^\circ C$,

sob luz fluorescente e fotoperíodo de 12 h. Frequentemente, o fitopatôgeno era reisolado de frutos inoculados e sintomáticos para manter a patogenicidade. As suspensões de esporos utilizadas nos testes foram obtidas de uma placa contendo cultura com idade de 7 dias, em BDA. A suspensão de esporos foi realizada em suco de maçã a 4% para os testes *in vitro* e em água destilada para os testes *in vivo*.

Os reagentes foram adquiridos de diferentes empresas, conforme a Tabela 9.

Tabela 9 – Origem dos reagentes utilizados nos experimentos de fumigação com suas respectivas fórmulas moleculares (FM) e pesos moleculares (PM).

REAGENTE	FM	PM	ORIGEM
Ácido acético P.A.	CH ₃ COOH	60,05	Proquimios Comercio e Industria Ltda
Ácido fórmico	CH ₂ O ₂	46,01	Proquimios Comercio e Industria Ltda
Ácido propanóico P.S.	C ₃ H ₆ O ₂	74,08	Vetec Química Fina Ltda
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100,16	Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)
Álcool etílico absoluto (etanol)	C ₂ H ₅ OH	46,07	Cromato Prod. Quim. Ltda. (marca CRQ)

4.2.2 Efeito da fumigação, *in vitro*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico e com etanol sobre a germinação de esporos de *P. expansum*

O efeito dos compostos voláteis sobre a germinação de esporos foi avaliado através da deposição de alíquotas de 80 µL da suspensão de esporos de *P. expansum* (10⁵ conídios.mL⁻¹) nas cavidades de lâminas escavadas. As lâminas foram acondicionadas dentro de bandejas plásticas (Sanremo Top Stock 400x270x133(mm), Brasil), duas lâminas por bandeja, e no centro de cada bandeja foi depositada uma placa de Petri com 50 mm de diâmetro que recebera o agente fumigante. Foram avaliados, em diferentes experimentos, os ácidos fórmico, acético e

propanóico, nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 12 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar; e o etanol nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar. Em cada experimento, considerou-se como testemunha a deposição de uma alíquota de água destilada no centro da bandeja. Após a deposição do composto, as bandejas foram mantidas fechadas por um período de 60 minutos. Transcorrido o tempo de fumigação, as bandejas foram abertas, as lâminas escavadas foram retiradas e colocadas em capela de exaustão por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em placas de Petri sob alta umidade relativa, no escuro, a $25\pm 1^\circ\text{C}$, por 16 horas. Em cada repetição, foram avaliados 100 esporos quanto à germinação e 30 quanto ao comprimento do tubo germinativo. O delineamento experimental foi completamente casualizado com três repetições por tratamento. Cada bandeja, contendo duas lâminas escavadas, correspondeu a uma repetição.

4.2.3 Efeito da fumigação, *in vivo*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico, e com hexanal ou etanol sobre a incidência e severidade da podridão de *P. expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

Frutos de macieira da cv. Fuji foram imersos em hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos, lavados em água corrente e deixados a secar à temperatura ambiente. Após secar, os frutos foram marcados com caneta para Retroprojektor Ponta Média (Faber-Castell, Brasil), fazendo-se dois círculos por fruto, na região equatorial, com aproximadamente 15 mm de diâmetro cada. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas com a superfície da região equatorial demarcada voltada para cima. No centro de cada círculo, foi depositada uma alíquota de 25 μL de suspensão de esporos de *P. expansum* (10^6 conídios. mL^{-1}). Após a secagem do inóculo, cada bandeja recebeu uma alíquota de um agente fumigante, colocada sobre uma placa de Petri disposta no centro da bandeja. As bandejas foram fechadas com as tampas plásticas deixando o agente fumigante agir, sob temperatura ambiente, por 60 minutos. Transcorrido o tempo de fumigação, as bandejas foram abertas e as placas de Petri foram retiradas, deixando-se arejar por 30 minutos. Em seguida, os frutos foram feridos, no centro de cada círculo demarcado, com uma agulha (1 mm x 5 mm) previamente flambada. As bandejas foram então incubadas em sala de crescimento com temperatura controlada ($25\pm 1^\circ\text{C}$), no escuro, em condições de alta umidade relativa. Foram realizadas quatro repetições por tratamento e cada repetição foi constituída por uma bandeja contendo 4 frutos. Nesse

experimento, foram testados o ácido acético, o ácido fórmico e o etanol nas concentrações de 5 e 10 μL por litro de ar.

Um segundo experimento foi realizado nos moldes do descrito acima, avaliando-se o efeito dos ácidos acético (5 $\mu\text{L.L}^{-1}$), fórmico (2,5 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e propanóico (5 μL e 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$), além do etanol (20 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e do hexanal (20 $\mu\text{L.L}^{-1}$). Nesse experimento, os fumigantes foram depositados nas bandejas antes da secagem completa do inóculo de *P. expansum*.

Os experimentos foram avaliados periodicamente quanto à incidência e à severidade da doença. Para tanto, em cada fermento foi avaliado o diâmetro médio da lesão realizando-se leituras em sentidos ortogonais com o auxílio de uma régua. A partir do valor médio do diâmetro das lesões ao longo do tempo, em cada repetição, calculou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), conforme Shaner e Finney *apud* De Capdeville et al. (2002): $\text{AACPD} = \sum [(y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)]$, onde y_i representa o diâmetro médio da lesão no tempo t_i , e y_{i+1} é o diâmetro da lesão no tempo t_{i+1} . A incidência foi calculada a partir do número de frutos que apresentavam sintomas em cada tratamento, pela fórmula: $\% \text{Incidência} = (\text{n}^\circ \text{ de frutos infectados} / \text{n}^\circ \text{ total de frutos}) \times 100$.

4.3 Resultados

4.3.1 Efeito da fumigação, *in vitro*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico ou com etanol na germinação de esporos de *P. expansum*

Na Tabela 10 é possível verificar o efeito da fumigação de ácido fórmico por 30 minutos na germinação de esporos de *P. expansum* em lâmina escavada. Nota-se que houve efeito da concentração do agente fumigante. Quanto maior a concentração do ácido na bandeja, sob temperatura ambiente, maior a inibição da germinação de esporos. A concentração de 12 $\mu\text{L.L}^{-1}$ inibiu completamente a germinação, enquanto que na concentração de 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$ houve uma redução expressiva (95,5%), quando comparada à testemunha.

O comprimento do tubo germinativo foi reduzido até mesmo na menor concentração avaliada (2 $\mu\text{L.L}^{-1}$). No entanto, maiores reduções foram observadas com o aumento da concentração do agente fumigante. Na concentração de 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$, houve uma redução de, aproximadamente,

89% na germinação de esporos de *P. expansum* comparada à testemunha.

Tabela 10 – Efeito da fumigação com ácido fórmico sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

Ácido fórmico ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$92,5 \pm 2,2^{[1]}$	$372,6 \pm 23,1^{[2]}$
2	$66,7 \pm 5,3$	$216,9 \pm 40,5$
4	$33,5 \pm 4,4$	$120,7 \pm 35,1$
8	$4,2 \pm 3,1$	$42,5 \pm 16,6$
12	0	0

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Houve efeito de concentrações de ácido fórmico pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Equações correspondentes ao efeito de ácido fórmico sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 0,01x^2 - 1,80x + 94,56$ e $R^2 = 0,99$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 0,03x^2 - 6,90x + 357,04$ e $R^2 = 0,98$.

A fumigação de ácido acético na concentração de $12 \mu\text{L.L}^{-1}$ inibiu completamente a germinação de esporos de *P. expansum* (Tabela 11). Concentrações menores de ácido acético também reduziram a germinação. A concentração de $8 \mu\text{L.L}^{-1}$ reduziu em 84% a germinação e em 73% o comprimento do tubo germinativo, quando comparados ao controle.

Tabela 11 – Efeito da fumigação com ácido acético sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

Ácido acético ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$93,7 \pm 2,3^{[1]}$	$384,4 \pm 38,4^{[2]}$
2	$76,6 \pm 4,3$	$296,3 \pm 47,7$
4	$41,2 \pm 6,6$	$200,7 \pm 42,1$
8	$14,7 \pm 8,5$	$104,5 \pm 39,3$
12	0	0

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Houve

efeito de concentrações de ácido acético pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Equações correspondentes ao efeito de ácido acético sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 0,01x^2 - 1,48x + 96,59$ e $R^2 = 0,98$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 353 - 3,05x$ e $R^2 = 0,98$.

A exemplo dos ácidos fórmico e acético, a fumigação com ácido propanóico a $12 \mu\text{L.L}^{-1}$ também inibiu completamente a germinação de esporos de *P. expansum*. Na concentração de $8 \mu\text{L.L}^{-1}$, houve uma redução de 68% na germinação e de 57% na elongação do tubo germinativo quando comparado com a testemunha (Tabela 12). Neste caso, também é possível verificar que a inibição da germinação e do comprimento do tubo é dependente da concentração do ácido, sendo que quanto maior a concentração de ácido no ambiente, maior o efeito inibitório.

Tabela 12 – Efeito da fumigação com ácido propanóico sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

Ácido propanóico ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$94,6 \pm 2,4^{[1]}$	$379,8 \pm 32,2^{[2]}$
2	$81,3 \pm 3,5$	$322,9 \pm 50,7$
4	$52,7 \pm 5,2$	$258,6 \pm 38,5$
8	$30,2 \pm 4,7$	$164,2 \pm 45,3$
12	0	0

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Houve efeito de concentrações de ácido propanóico pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Equações correspondentes ao efeito de ácido propanóico sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 92,74 - 0,79x$ e $R^2 = 0,98$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 353 - 3,05x$ e $R^2 = 0,98$.

Por outro lado, a fumigação com etanol pouco afetou o desenvolvimento *in vitro* do fitopatógeno (Tabela 13). Na maior concentração avaliada de etanol ($20 \mu\text{L.L}^{-1}$), verificou-se uma redução de, aproximadamente, 7% na germinação de esporos de *P. expansum* (não significativa) e de 39% na elongação do tubo germinativo (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeito da fumigação com etanol sobre a germinação e o comprimento do tubo germinativo de esporos de *Penicillium expansum* em lâminas escavadas.

Etanol ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar)	Germinação de esporos (%)	Tubo germinativo (μm)
0	$95,3 \pm 2,4^{[1]}$	$374,6 \pm 18,9^{[2]}$
5	$92,2 \pm 2,8$	$362,7 \pm 25,6$
10	$90,4 \pm 2,1$	$292,2 \pm 21,9$
15	$89,7 \pm 2,6$	$234,5 \pm 15,7$
20	$88,9 \pm 3,1$	$228,1 \pm 19,4$

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de esporos e do crescimento do tubo germinativo de *P. expansum*, respectivamente. Não houve efeito de concentrações do etanol sobre a germinação do fungo pelo teste F a 5%. Houve efeito de concentrações sobre o comprimento do tubo germinativo. Equações correspondentes ao efeito de etanol sobre a germinação de esporos de *P. expansum*: $y = 93,2 - 0,02x$ e $R^2 = 0,92$; e sobre o comprimento do tubo germinativo: $y = 388,27 - 0,88x$ e $R^2 = 0,94$.

4.3.2 Efeito da fumigação, *in vivo*, com os ácidos fórmico, acético e propanóico, e com hexanal ou etanol sobre a incidência e severidade de *P. expansum* em frutos de macieira cv. Fuji

A fumigação com ácido acético, na concentração de 10 μL por L de ar, após a secagem da suspensão de esporos e antes da ocorrência do ferimento na epiderme, foi eficiente em inibir o crescimento do fitopatógeno *P. expansum* (Figura 27). Em concentração reduzida (5 $\mu\text{L.L}^{-1}$), a fumigação com ácido acético diminuiu a incidência em 62,5% e a severidade da podridão em 94,9% quando comparada com a testemunha absoluta. A incidência e a severidade de *Penicillium* em frutos fumigados com ácido fórmico a 5 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar foram de 6,25 e 1,2%, respectivamente. O aumento da concentração do ácido para 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar proporcionou uma redução de 87,5% na incidência e 95,7% na severidade comparada a testemunha. Houve uma maior incidência de frutos com sintomas aparentes de fitotoxidez, caracterizados pelo aparecimento de manchas necróticas com 2 mm de diâmetro e coloração marrom escuro, na fumigação com ácido fórmico a 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (dados não mostrados).

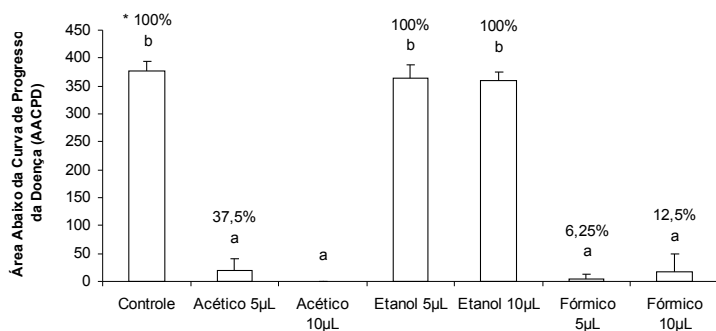


Figura 27 – Severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira cv. Fuji após inoculação com 10^6 esporos.mL⁻¹ e fumigação por 60 minutos com ácido acético, etanol, ou ácido fórmico, nas concentrações de 5 e 10 µL por L de ar, sob temperatura ambiente. Água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * Incidência de frutos sintomáticos.

Nas condições do presente experimento, a fumigação com etanol, nas duas concentrações avaliadas (5 ou 10 µL.L⁻¹), não reduziu a incidência e a severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira (Figura 27).

O efeito da fumigação dos compostos voláteis, por 60 minutos, antes da secagem completa da suspensão de esporos de *P. expansum* (25 µL, 10^6 conídios.mL⁻¹) que fora depositada na epiderme intacta de frutos Fuji pode ser verificado na Figura 28.

A fumigação com ácido acético na concentração de 5 µL.L⁻¹ reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira da cv. Fuji em 66,7% comparada à testemunha (água destilada). No entanto, a incidência de frutos sintomáticos foi elevada (76%). A fumigação com ácido fórmico reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 58% e a incidência em 43% comparado à testemunha.

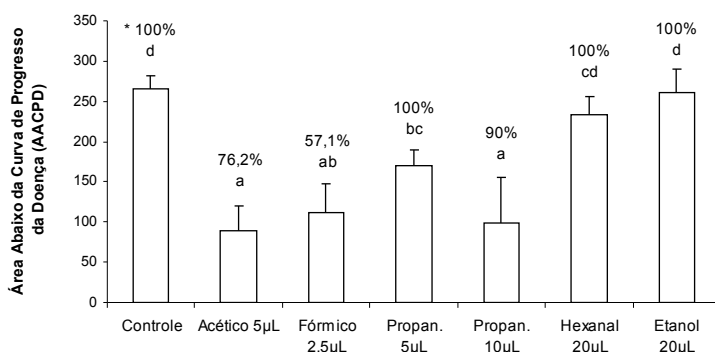


Figura 28 – Severidade da podridão de *Penicillium* em frutos de macieira cv. Fuji após inoculação com 10^6 esporos.mL⁻¹ e fumigação por 60 minutos com ácido acético (5 µL), ácido fórmico (2,5 µL), ácido propanóico (5 µL e 10 µL), etanol (20 µL), hexanal (20 µL) por litro de ar, sob temperatura ambiente. Água destilada foi utilizada como controle. Barras (médias \pm desvio-padrão), seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *Incidência de frutos sintomáticos.

Já na fumigação dos frutos com ácido propanóico, apenas a maior concentração (10µL por litro de ar) reduziu a severidade da podridão de *Penicillium* em 63%, mas não alterou a incidência da doença (Figura 28). Por sua vez, a fumigação com etanol ou hexanal, ambos na concentração de 20 µL.L⁻¹ de ar, não reduziu a incidência e a severidade da podridão de *Penicillium* nos frutos de macieira cv. Fuji.

4.4 Discussão

O uso da técnica de fumigação com compostos voláteis mostrou-se promissor para reduzir o desenvolvimento de *P. expansum* em frutos de macieira assintomáticos que apresentavam, em sua epiderme intacta, uma elevada concentração de inóculo do fitopatógeno responsável por elevadas perdas no período denominado pós-colheita.

A fumigação de maçãs com ácidos orgânicos de cadeia curta (fórmico, acético e propanóico) possibilitou uma redução da incidência e severidade da podridão de *P. expansum*. Conforme verificado por

Sholberg e Owen (1990), os frutos geralmente carregam em sua superfície um número elevado de esporos de *Penicillium* spp. provenientes da imersão durante as operações de classificação e embalagem nos *packing houses* ou aderidos em restos culturais que os acompanham. A ocorrência de fermento ou lesões na epiderme do fruto durante as operações de embalagem, transporte ou acondicionamento nos entrepostos e mercados locais poderia aumentar a suscetibilidade à invasão e colonização do tecido exposto por fitopatógenos que estão aderidos à sua superfície, aumentando a ocorrência de podridões pós-colheita.

O modo de ação de um ácido está fortemente relacionado com a parcela indissociável da molécula, que é mais importante do que qualquer alteração no pH que a adição deste ácido ao meio poderia provocar (SEATON, 1993). De acordo com Doores (1990), as formas dissociadas de ácidos fracos geralmente não são absorvidas pelos microrganismos em grandes quantidades.

Cherrington et al. (1990) associaram a atividade bacteriostática de alguns ácidos orgânicos com a penetração das formas não dissociadas destes ácidos na membrana lipídica da célula bacteriana e uma vez internalizados no pH neutro do citoplasma da célula, dissociam-se em ânions e prótons. Acredita-se que os prótons seriam responsáveis pela acidificação do citoplasma, interferindo na maioria das funções celulares, inibindo a glicólise, afetando a sinalização celular e inibindo o transporte ativo (STRATFORD; EKLUND, 2003), ao passo que os ânions poderiam inibir a síntese de DNA, em diferentes graus, dependendo do composto utilizado (RICKE, 2003). Além disso, a exportação de prótons que estão em excesso no citoplasma requer um alto consumo de energia (ATP) pela célula o que pode resultar em diminuição da energia celular disponível para outros fins (DAVIDSON, 2001). Sheu e Freese (1972) sugeriram que os ácidos orgânicos de cadeia curta interferem com o metabolismo energético pela alteração da estrutura da membrana citoplasmática devido a uma interação com as proteínas da membrana.

Os ácidos fórmico e acético, em pequenas concentrações e em condições de pressão e temperatura ambientes, possibilitaram elevada redução na incidência e na severidade da podridão de *Penicillium* comparados à fumigação com outros compostos. No entanto, a fumigação com estes ácidos antes da completa secagem da suspensão de esporos que fora depositada na superfície intacta dos frutos foi menos eficiente. Provavelmente, a difusão desses ácidos para a água que

continha a suspensão de esporos foi menor devido ao período de exposição (60 minutos) e à baixa saturação da atmosfera pela concentração do ácido. Shouberg e Gaunce (1996) relacionaram o efeito de fitotoxidade observado no tratamento com vapor de ácido acético, caracterizado por um bronzeamento da casca de pêssegos, à presença de água na superfície dos frutos.

Nos experimentos *in vitro*, no entanto, pode ter ocorrido uma maior difusão dos ácidos na suspensão de esporos devido ao fato de que as suspensões foram preparadas em meio concentrado de solutos (suco de maçã a 4%).

A fumigação com ácido fórmico na maior concentração avaliada ($10 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar) causou injúrias na epiderme dos frutos, o que pode ter aumentado a suscetibilidade do tecido hospedeiro à infecção e colonização pelo fitopatógeno, aumentando assim a incidência e a severidade (Figura 28) da podridão de *Penicillium*. Embora visualmente não fosse possível detectar algum tipo de injúria em função da fumigação do ácido na concentração de $5 \mu\text{L.L}^{-1}$, supõe-se que neste caso também ocorreram microlesões que estariam expondo o tecido e aumentando a agressividade do fitopatógeno.

Outros autores já haviam associado o aparecimento de podridões em frutos fumigados com ácidos à ocorrência de fitotoxidez. Perera e Karunaratne (2001), por exemplo, verificaram que bananas fumigadas com ácido acético apresentavam escurecimento e necrose da casca, o que evoluiu até o surgimento de sintomas de antracnose. Sholberg (1998) havia demonstrado que o tratamento de cerejas com ácido acético causava injúrias caracterizadas por manchas deprimidas na epiderme dos frutos. No presente trabalho, a fumigação dos frutos de macieira cv. Fuji com ácido acético não apresentou sintomas aparentes de fitotoxidez, independentemente da concentração do ácido avaliada (5 e $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar).

A eficiência da ação de fumigação com ácido acético para controlar *B. cinerea* ou *P. expansum* em maçãs da cv. Spartan foi dependente da umidade relativa no ambiente de fumigação e da concentração de inóculo (Sholberg e Gaunce, 1995). Os autores verificaram, por exemplo, que na fumigação com 2 mg.mL^{-1} de ácido acético, sob 17% de umidade relativa os frutos apresentavam uma área deteriorada com, aproximadamente, 46 mm de diâmetro causada por *B. cinerea*, enquanto que nessa mesma concentração do ácido e em umidade relativa de 98% os frutos não apresentavam sintomas aparentes. Ainda de acordo com Sholberg e Gaunce (1995), quanto

maior a concentração de esporos na superfície do fruto, maior deverá ser a concentração do ácido acético necessário para controlar a podridão. Baert et al. (2008) observaram ocorrência de *P. expansum* em mais de 90% das inoculações, quando o número de conídios na suspensão foi igual ou superior a 2.10^4 esporos, em maçãs cv. Boskoop inoculadas e mantidas em temperaturas de 4, 12 ou 25°C.

Quanto ao emprego do ácido acético como agente fumigante, Lagopodi et al. (2009) observaram que a fumigação com este ácido promoveu, inibiu ou não teve influência sobre o crescimento de *B. cinerea in vitro*, sendo que as diferenças eram dependentes do tempo de exposição e da concentração do ácido. Os autores verificaram que, nas concentrações que variavam de 1 a 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$, o efeito inibitório era dependente do tempo de exposição que o fungo era submetido. Períodos de exposição de 6 minutos na concentração de 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$ inibiram completamente o crescimento *in vitro* de *Botrytis*, enquanto que neste mesmo período e em concentrações de 1 ou 2 $\mu\text{L.L}^{-1}$ houve um estímulo do crescimento. Na fumigação por 3 minutos, as concentrações de 2 ou 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$ estimularam e nas concentrações de 6 ou 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$ inibiram o crescimento micelial. Os autores concluíram que na presença de pequenas quantidades de ácido acético, o fungo poderia estar usando esse composto como fonte de carbono.

A fumigação com etanol, nas concentrações avaliadas, não reduziu a severidade nem a incidência da podridão de *P. expansum* em frutos de macieira cv. Fuji nas condições do presente experimento. As concentrações avaliadas provavelmente estavam aquém do necessário para causar algum efeito fungicida ou fungistático. Existem relatos de resultados positivos quanto à utilização do etanol para o controle de podridões pós-colheita. Chervin et al. (2005), por exemplo, verificaram que a exposição de uvas ao vapor de etanol (2 mL.kg^{-1}) por duas horas foi tão eficaz quanto à fumigação com SO_2 no controle de *B. cinerea*. A fumigação com etanol a 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ por duas horas reduziu as podridões causadas por *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., e *Fusarium* spp. em *Myrica rubra*, armazenados a 20 e a 0°C (Chen et al., 2007). Por outro lado, Lagopodi et al. (2009) relataram que ocorreu um estímulo no crescimento micelial de *B. cinerea in vitro* com a fumigação de etanol, nas concentrações de 100 ou 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$, por 3 ou 6 minutos.

Neri et al. (2009) avaliaram o efeito de compostos voláteis, entre eles o hexanal, sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Neofabraea alba*. Os autores verificaram que a exposição a 98,4 μL

de hexanal e *trans*-2-hexenal por litro de ar inibiu completamente a germinação de conídios do fitopatógeno. Os mesmos autores relataram ainda que a fumigação com baixas concentrações de *trans*-2-hexenal e hexanal estimulou o crescimento micelial do fitopatógeno, demonstrando que os compostos voláteis de plantas podem ter tanto um efeito inibidor quanto uma ação estimulante sobre o crescimento fúngico, dependendo da concentração empregada e da fase em que se encontra o fungo. Spotts et al. (2007) constataram que a fumigação com hexanal na concentração de $944 \mu\text{L.L}^{-1}$ não teve efeito sobre a incidência de olho-de-boi e que estimulou a podridão de *Penicillium* em peras d'Ánjou.

O emprego da técnica de fumigação com compostos voláteis não deve se restringir apenas ao uso para redução da contaminação superficial da epiderme de frutos. A sanitização do ambiente de armazenamento, beneficiamento e embalagem poderia se tornar uma prática usual, dependendo do composto empregado para essa finalidade. Segundo Sholberg (2004), uma das estratégias de controle de podridões pós-colheita seria reduzir ou eliminar o inóculo inicial, retardando o aparecimento da doença, a evolução da podridão e o volume total de perdas.

O efeito da fumigação com ácido acético sobre a ocorrência, em *packing house*, de contaminação por *Penicillium* spp. em madeira compensada, nas tubulações, em aço galvanizado, nos pisos e no ar foi observado por Sholberg e Stokes (2006). Os autores relataram que a fumigação reduziu a ocorrência de contaminação em 97, 100, 80, 99 e 96%, respectivamente, tendo por base de cálculo o número de UFC/cm² de *Penicillium* spp. antes e após a fumigação. Sholberg (2004) também determinou o efeito da fumigação com ácido acético na contaminação de bins comerciais por *Penicillium* spp. Câmaras contendo internamente diferentes quantidades de bins em *packing house* foram fumigadas, verificando-se um percentual de redução na contaminação que variou de 72 a 100%. Essa diferença foi atribuída ao fato de que foi difícil manter a concentração ideal de vapor do ácido acético por um período de duas horas, assim como às baixas temperatura e umidade relativa.

A partir dos resultados observados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, pode-se sugerir que os ácidos que apresentam cadeia de carbono curta (fórmico, acético e propanóico) apresentam potencial para reduzir a concentração inicial de inóculo que se encontra tanto na epiderme dos frutos como nas embalagens de acondicionamento. Além disso, a eficiência de controle poderá depender da concentração do ácido, das

condições atmosféricas no ambiente de fumigação (temperatura e umidade relativa), da capacidade de volatilização, dispersão e difusão destes ácidos e do uso de equipamentos que aumentem a volatilidade por métodos físicos (pressão e temperatura).

5 Conclusões

(i) a imersão de frutos de macieira em suspensões de quitosana reduziu a severidade das podridões pós-colheita causadas pelos fungos *P. expansum* e *B. cinerea*, sendo que a eficiência de controle foi dependente da concentração do polissacarídeo e do tipo de imersão (preventiva ou curativa);

(ii) a quitosana apresentou atividade antifúngica, efeito fungicida e/ou fungistático, contra os fitopatógenos *P. expansum* e *B. cinerea*, o qual pode ter proporcionado uma redução da pressão de inóculo;

(iii) no geral, houve um aumento da eficiência antifúngica das suspensões com concentração reduzida de quitosana (0,25%), combinadas com os plastificantes glicerol (0,75%) ou sorbitol (1,5%), e com os surfactantes estearato de magnésio (0,1%) e Tween 80 (0,1%), na imersão de frutos inoculados com *P. expansum* ou *B. cinerea*;

(iv) a incorporação de CaCl_2 ou K_2CO_3 à suspensão de quitosana reduziu a eficiência antifúngica do revestimento formado por imersão dos frutos contra *P. expansum* ou *B. cinerea*;

(v) o peso molecular da quitosana teve influência na atividade antifúngica contra *B. cinerea*.

6 Referências bibliográficas

AGROFIT. SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 out. 2010.

AHARONI, Y. et al. Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 201-206, 1997.

ALVINDIA, D.G.; NATSUAKI, K.T.. Control of crown rot-causing fungal pathogens of banana by inorganic salts and a surfactant. **Crop Protection**, v. 26, p. 1667-1673, 2007.

AMIRI, A.; BOMPEIX, G.. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. **Plant Pathology**, v. 54, p. 74-81, 2005.

ANDRESEN, I. et al. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate induced proteins in barley (*Hordeum vulgare*). **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 193-204, 1992.

ARAÚJO, S.A.. **Escurecimento enzimático em alimentos**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, v. 231, 14 p., 1990.

ABPM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>>. Acesso em: 01 jun. 2008.

AVISSAR, I.; PESIS, E. The control of postharvest decay in table grapes using acetaldehyde vapours. **Annals of Applied Biology**, v. 118, p. 229-237, 1991.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I.. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, p. 110-117, 2009.

BAERT, K. et al. The effect of inoculums size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Food Microbiology**, v. 25, p. 212-217, 2008.

BAI, R.K.; HUANG, M.Y.; JIANG, Y.Y. Selective permeabilities of chitosan-acetic complex membrane and chitosan-polymer complex for oxygen and carbon dioxide. **Polymer bulletin**, v. 20, p. 83-88, 1988.

BAKSHI, P.; FA, M.; GS, C.; TA, S.. Role of calcium in post-harvest life of temperate fruits: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-8, 2005.

BALESTRIERI, F. et al. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility. **Thermochimica Acta**, v. 285, p. 337-345, 1996.

BRDE. BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Cadeia produtiva da maçã**: produção, armazenagem, comercialização, industrialização e financiamentos do BRDE na região sul do Brasil. Porto Alegre: BRDE, 2005. 65 p.

BANKER, G.S.. Film coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 1, p. 81-89, 1966.

BARBOSA-CANOVAS, G. et al. Chemicals and biochemicals used in food preservation. In: **Non-thermal preservation of foods**. Marcel Dekker: New York, 1998. p.215-233.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, p. 1087–1092, 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 22, p. 178-186, 2004.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v. 22, p. 285-290, 2002.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v. 22, p. 285-290, 2003.

BENHAMOU, N.. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. **Phytopathology**, v. 82, p. 1185-1193, 1992.

BERG, J.C.. Wettability. In: BERG, J.C. **Role of acid-base interactions in wetting and related phenomena**. Marcel Dekker: New York, 1993. p. 75–148.

BHASKARA REDDY, B.M.V. et al. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p. 33–43, 1998.

BHASKARA REDDY, B.M.V. et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1208-1216, 1999.

BHASKARA REDDY, B.M.V. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on postharvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 39-51, 2000.

BLANPIED G.D.; PURNASIRI A... *Penicillium* and *Botrytis* rot of McIntosh apples handled in water. **Plant Disease Reporter**, v. 52, p. 865-867, 1968.

BLEICHER, J.; BERNARDI, J.. **Podridões da maçã e seu controle na pós-colheita**. Florianópolis: EMPASC, 1985. 20 p.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2003. 238p.

BONETI, J. I. S., RIBEIRO, L. G. & KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 149p.

BOTHA, S.A.; LÖTTER, A.P.. Compatibility study between naproxen and tablet excipients using differential scanning calorimetry. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 4, p. 673-683, 1990.

BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEADER, M.D. et al. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1115-1123, 1995.

BRUL, S.; COOTE, P.. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.113-168.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. et al. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L.. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 379-385, 2009.

CASARIEGO, A. et al. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1452–1459, 2008.

CASTELLARNAU, I.I. Situación mundial y perspectivas de las principales variedades de manzana. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, Caçador. **Anais do Encontro Nacional sobre fruticultura de clima temperado**. Fraiburgo: Epagri, 2004.

CERVERA, M.F. et al. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. **Pharmaceutical Science Technology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2004.

CERVERA, M.F. et al. Determination of tackiness of chitosan film-coated pellets exploiting minimum fluidization velocity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, p. 119–127, 2004.

CHARDONNET, C.O. et al. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects of calcium on this fungus. **Postharvest Pathology and Mycotoxins**, v. 90, n. 7, p. 769-774, 2000.

CHEAH, L. H.; PAGE, B.B.C., SHEPHERD, R.. Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot in carrots. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 25, p. 89-92, 1997.

CHEN, R.H.; HWA, H.D.. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 4, p. 353-358, 1996.

CHEN, M.C.; YEH, G.H.C.; CHIANG, B.H.. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 379-390, 1996.

CHEN, K.S. et al. Ethanol vapour treatment alleviates postharvest decay and maintains fruit quality in Chinese bayberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 195-198, 2007.

CHENG, C.Y.; LI, Y.K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 32, p. 197-203, 2000.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I.. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 69-74, 1990.

CHERVIN, C.; WESTERCAMP, P.; MONTEILS, G.. Ethanol vapours limit *Botrytis* development over the postharvest life of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, p. 319-322, 2005.

CHIEN, P.J.; SHEU, F.; LIN, H.R.. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1160-1164, 2007.

CHOI, W. et al. Wettability of chitosan coating solution on “Fuji” apple skin. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 2668-2672, 2002.

CHU, C. L. et al. Control of post harvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and

acetic acid. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 79, p. 685-689, 1999.

CONWAY, W.S. et al. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. **Phytopathology**, v. 78, n. 8, p. 1052-1055, 1988.

CONWAY, W.S. et al. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. **Plant Disease**, v. 76, n. 4, p. 329-334, 1992.

CUERO, R.G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-Carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 441-444, 1991.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In Rooney, M.L.. **Active Food Packaging**, p.111-142, 1995.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Editors). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**, 2nd edition. Washington, D.C.: ASM Press, 2001. p.593–627.

DE CAPDEVILLE, G. et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest “Red Delicious” apple fruit. **Phytopathology**, v. 92, p. 900-908, 2002.

DEVILIEGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703-714, 2004.

DHINGRA, O.D. Patologia pós-colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.122, p.46-50, 1985.

DI PIERO, R.M., PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 57-62, 2004.

DCD. DIÁRIO DA CÂMARA DOS DEPUTADOS. 2007. Disponível em:

<http://imagem.camara.gov.br/Imagem/d/pdf/DCD09FEV2007.pdf#page=148>. Acesso em: 02 jun. 2008.

DONG, H. et al. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 355-358, 2004.

DOORES, S.. pH control agents and acidulants. In: BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; SALMINEN, S. (Eds). **Food additives**. Marcel Dekker: New York, p.477-510, 1990.

DOORES, S.. Organic acids. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Eds) **Antimicrobials in foods** (2nd Edn). Marcel Dekker: New York, p.95-136, 1993.

DROBY, S. et al. Suppressing green mold decay in grape fruit with postharvest jasmonates application. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 184-188, 1999.

DURANGO, A.M.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J. Microbiological evaluation of na edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. **Food Control**, v. 17, p. 336-341, 2006.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, p. 20-31, 2004.

EL GHOUTH, A. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 1618-1620, 1991.

EL GHOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 15, n. 5, p. 359-368, 1991.

EL GHOUTH, E.A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, p. 398-402, 1992.

EL GHOUTH, E.A. et al. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **HortScience**, v. 27, n. 9, p. 1016-1018, 1992b.

EL GHOUTH, A., SMILANICK, J.L., WILSON, C.L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 103-110, 2000.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://www.cnpqv.embrapa.br/>. Acesso em: 05 jun. 2008.

EPAGRI. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA - EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009** — **2010**. Disponível: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2010/sintese%202010_inteira.pdf Acesso em: 12 nov. 2010.

ERYANI-RAQUEEB, A.A. et al. Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). **International Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 53-68, 2009.

EVERDEEN, D.S. et al. Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*. **Plant Physiology**, v. 87, p. 616-621, 1988.

FALLIK, E. et al. (E)-2-Hexenal both stimulates and inhibits *Botrytis cinerea* growth *in vitro* and on strawberry fruit *in vivo*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, p. 875-881, 1998.

FELIPINI, R. B.; DI PIERO, R. M. Redução da severidade da podridão-amarga em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1591-1597, 2009.

FRANCO, D.A.S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 569-572, 2002.

FREESE, E.; SHEU, C.W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v. 241, p. 321-325, 1973.

FREESE, E.; LEVIN, B.C. Action mechanisms of preservatives and antiseptics. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 19, p. 207-227, 1978.

FRY, S.C. Cross-linkage of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1986.

GARCIA, J.M.; HERRERA, S.; MORRILA, A.. Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 30-33, 1996.

GASPAR, T. et al. **Peroxidases 1970-1980: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: University of Genève, 1982. 324p.

GERSHENZON, J. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: TAIZ, L.; ZEIGERZ, E. **Plant Physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.283-308.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. et al. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb: Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 541–547, 2008.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. et al. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 247-253, 2006.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. et al. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x*

ananassa) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 110, p. 428-435, 2008.

HERVIEUX, V. et al. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. **Plant Disease**, v. 86, p. 1014-1018, 2002.

HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R.. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1997, 650p.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, p. 462-468, 2001.

HIRANO, S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. **Polymer International**, v. 48, p. 732-734. 1999.

HIRANO, A.; NAGAO, N.. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 11, p. 3065-3066, 1989.

HOEPFNER, E.M.; RENG, A.; SCHMIDT, P.C. (Ed.). **Fiedler Encyclopedia of Excipients for Pharmaceutical, Cosmetics and Related Area**. 5. ed. Aulendorf: Cantor, 2002.

INOUE, T.T.. **Nutrição mineral de plantas**. Universidade Estadual de Maringá. Disponível em: [HTTP://www.fag.edu.br/professores/benetoli/Prof.%20Tadeu/Tadeu2.pdf](http://www.fag.edu.br/professores/benetoli/Prof.%20Tadeu/Tadeu2.pdf). Acesso em: 24 de março de 2010.

IBRAF. INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Setor da pomicultura reivindica incentivos**. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/news/news_item.asp?NewsID=62 . Acesso em: 01 jun. 2008.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 28 mai. 2008.

JIANG, Y.; LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 139-143, 2001.

JIANMING, D.; HIROSHI, G.; SHUICHI, I. Effects of chitosan coating on the storability and on the ultrastructural changes of "Jonagold" apple fruit in storage. **Food Preservation Science**, v. 24, n. 1, p. 23-29, 1998.

JITAREERAT, P. et al. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 35, n. 2, p. 211-218, 2007.

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. 100p.

KAFETZOPOULOS, D.; MARTINOU, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 2564-2568, 1993.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 83-89, 2003.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D.L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 859-863, 2003.

KIENZLE-STERZER, C.A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, D.; RHA, C.K. Mechanical properties of chitosan films: effect of solvent acid. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 183, p. 1353-1359, 1982.

KIM, S.H. et al. Effect of plasticizer concentration and solvent types on shelf-life of eggs coated with chitosan. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. S349-S353, 2006.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

LAGOPODI, A.L. et al. Acetic acid, ethanol and stem effects on the growth of *Botrytis cinerea* *in vitro* and combination of steam and modified atmosphere packaging to control decay in kiwifruit. **Journal Phytopathology**, v.157, p.79-84, 2009.

LI, Q. et al. A. Applications and properties of chitosan. In: GOOSEN, M. F. A. (Ed.) **Applications of chitin and chitosan**. Basel: Technomic, 1997. p. 3–29.

LI, X.F. et al. Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. **Iranian Polymer Journal**, v. 17, n. 11, p. 843-852, 2008.

LI, Y-C. et al. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot of potato tuber. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, p. 597-604, 2009.

LIU, W. T.; CHU, C. L.; ZHOU, T. Thymol and acetic acid vapors reduce post harvest brown rot of apricot and plums. **HortScience**, v. 37, p. 151-156, 2002.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 95, p. 147– 155, 2004.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300-306, 2007.

LOURDIN, D. et al. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. **Polymer: The Chemistry, Physics and Technology of High Polymer**, v. 38, n. 21, p. 5401-5406, 1997.

LUCHI, V.L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p. 59-104.

MALI, S. et al. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 283-289, 2005.

MARRIOTT, J.; BEEN, B.O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Plant Physiology**, v. 44, p. 38-42, 1978.

MENG, X. et al. Effects of chitosan and oligochitosan on groth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 70-75, 2010.

MICELI, A. et al. Effect of preharvest calcium treatment on decay and biochemical changes of table grape during storage. **Phytopathology Mediterranean**, v. 38, p. 47-53, 1999.

MLIKOTA GABLER, F.; SMILANICK, J. L. Postharvest control of table grape gray mold on detached berries with carbonate and bicarbonate salts and disinfectants. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 12-20, 2001.

MOLINE, H. E. et al. Comparison of three volatile natural products for the reduction of post harvest diseases in strawberries. **Advances in Strawberry Research**, v.16, p.43-48, 1997.

MÖLLER, H. et al. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan – HPMC – based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6581-6591, 2004.

MORRISON, T.A.; BUXTON, D.R. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize stalks. **Crop Science**, v. 33, p. 1264-1268, 1993.

MURA, P. et al. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 119, p. 71-79, 1995.

MUZARELLI, R.A.A. Filmogenic properties of chitin/chitosan. In: MUZARELLI, R.; Jeuniaux, C.; GOODAY, G.W. (Eds.). **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press: New York, 1986. p.389-396.

MUZARELLI, C.; MUZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2002.

NAVARRO-TARAZAGA, M.L.; SOTHORNVIT, R.; PÉREZ-GAGO, M.B. Effect of plasticizer type and amount on hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality of coated plums (cv. Angeleno). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9502-9509, 2008.

NIGRO, F. et al. Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 142-149, 2006.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. **Plant Pathology**, v. 55, p. 100-105, 2006.

NERI, F. et al. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, p. 425-430, 2009.

PALOU, L. et al. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of Clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 93-96, 2002.

PAPINEAU, A., M. et al. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v. 5, p. 45-57, 1991.

PARK, H.J. Development of advanced edible coatings for fruits. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.254-260, 1999.

PARK, S.Y.; MARSH, K.S. RHIM, J.W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 194-197, 2002.

PARK, S.I. et al. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria × ananassa*) to control mold growth during cold storage. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 202–207, 2005.

PASTER, N.; PINTHUS, E.; REICHMAN, D. A comparative study of the efficacy of calcium propionate, agrosil and adofeed as mold inhibitors in poultry feed. **Poult Science**, v. 66, p. 858-860, 1987.

PERERA, O.D.A.N.; KARUNARATNE, A.M. Response of bananas to postharvest acid treatments. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 70-76, 2001.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. New York: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PLASCENCIA-JATOMEA, M. et al. Effect of chitosan and temperatura on spore germination on *Aspergillus niger*. **Macromolecular BioScience**. v. 3, p. 582–586, 2003.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RHIM, J.W.; WELER, C.L.; HAM, K.S. Characteristics of chitosan films as affected by the type of solvent acid. **Food Science and Biotechnology**, v. 7, p. 263-268, 1998.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 80–86, 2000.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P.L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 2003.

ROBERTS, M. et al. Effect of punch tip geometry and embossment on the punch tip adherence of a model ibuprofen formulation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 947-950, 2004.

RODRÍGUEZ, M. et al. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, n. 39, p. 840-846, 2006.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 67-77, 1999.

RONCAL, T. et al. Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 823-829, 2002.

SANDERSON, P.G.; SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by *Penicillium*. **Phytopathology**, v. 85, p. 103-110, 1995.

SASS, P. **Fruit storage**. Budapeste, Hungria: Mezogazda Kiado, 1993. p.41-53, p.350.

SEATON, W.H. Acetic acid. In: AGREDA, V.H.; ZOELLER, J.R. (Eds). **Acetic acid and its derivatives**, Marcel Dekker: New York, 1993. p.73-100,

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 54-56, 2003.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998, 144p.

SHARPLES, R.O.; JOHNSON, D.S. The influence of calcium on senescence changes in apples. **Annals of Applied Biology**, v. 85, p. 450-453, 1977.

SHEU, C.W.; FREESE, E. Effects of fatty acid on growth and enveloped proteins of *Bacillus subtilis*. **The Journal of Bacteriology**, v. 111, p. 525-530, 1972.

SHOLBERG, P.L.; OWEN, G.R. Population of propagules of *Penicillium* spp. during immersion dumping of apples. **Canadian Plant Disease Survey**, v. 70, p. 11-14, 1990.

SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A.P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. **HortScience**, n. 30, p. 1271-1275, 1995.

SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A.P. Fumigation of stonefruit with acetic acid to control postharvest decay. **Crop Protection**, n. 8, v. 15, p. 681-686, 1996.

SHOLBERG, P.L.; REYNOLDS, A.G.; GAUNCE, A.P. Fumigation of table grapes with acetic acid to prevent postharvest decay. **Plant Disease**, v. 80, p. 1425-1428, 1996.

SHOLBERG, P.L. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 689-693, 1998.

SHOLBERG, P.L.; CLIFF, M.; MOYLS, A.L. Fumigation with acetic acid vapor to control decay of stored apples. **Fruits**, v. 56, n. 5, p. 355-366, 2001.

SHOLBERG, P.L. **Bin and storage room sanitation**. 2004. Disponível em: <http://www.deccous.com/userfiles/fck/Bin-StorageRoom-Sanitizing.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2010.

SHOLBERG, P.L. et al. Use of measured concentrations of acetic acid vapour to control postharvest decay in d'Anjou pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 89-98, 2004.

SHOLBERG, P.L.; STOKES, S. Apple packinghouse sanitation in British Columbia in 2005. **Canadian Plant Disease Survey**, n. 86, p. 123-124, 2006.

SIMKOVIC, M. et al. Ca^{2+} - dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 54, p. 291-298, 2008.

SIVAKUMAR, D. et al. Effect of ammonium carbonate and sodium bicarbonate on anthracnose of papaya. **Phytoparasitica**, v. 30, n. 5, p. 486-492, 2002.

SMILANICK, J.L. et al. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Disease**, v. 83, p. 139-145, 1997.

SMILANICK, J.L. et al. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Disease**, v. 83, p. 139-145, 1999.

SMILANICK, J.L. et al. Influence of pH and NaHCO_3 on the effectiveness of imazalil to inhibit germination of spores of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. **Plant Disease**, v. 89, p. 640-648, 2005.

SNOWDON, A.L. **A color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables – general introduction and fruits**. London: Wolfe Scientific, v. 2, 1990.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of b-lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, p. 149-155, 2001.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging**. Elsevier Publishers: New York, 2005. p. 403-433.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, p. 141-151, 2004.

SPOTTS, R.A.; CERVANTES, L.A. Population, pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packing houses. **Plant Disease**, v. 70, p. 106-108, 1986.

SPOTTS, R.A. et al. Effects of 1-MCP and hexanal on decay of d'Anjou pear fruit in long-term cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 101-106, 2007.

STADELBACHER, G.J.; PRASAD, K. Postharvest decay control of apple by acetaldehyde vapour. **American Society for Horticultural Science**, v. 99, n. 4, p. 364-368, 1974.

STRATFORD, M.; EKLUND, T. Organic acids and esters. In: RUSSELL, N.J.; GOULD, G.W. (Editors). **Food preservatives**. 2nd edition. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 48-84.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**. v. 6, p. 257-272, 1992.

TAHA, S.M.; SWAILAM, H.M. Antibacterial activity of chitosan against *Aeromonas hydrophila*. **Nahrung**, v. 46, n. 5, p. 337-340, 2002.

TENG, W.L. et al. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. **Carbohydrate Polymers**, v. 332, p. 305-316, 2001.

TSIGOS, I. et al. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 305-312, 2000.

UTAMA, I.M.S. et al. *In vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6371-6377, 2002.

VALDEBENITO SANHUEZA, R.M. **Desinfecção da água e das câmaras frigoríficas para diminuição do inóculo de *Penicillium expansum***. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1991. 16 p.

VALDEBENITO SANHUEZA, R.M. **Recomendações para o controle pós-colheita das podridões de maçãs**. Vacaria: Embrapa Uva e Vinho, 1996. 4 p.

VALDEBENITO SANHUEZA, R.M. Podridões de maçãs frigorificadas. In: GIRARDI, C.L. (Org.). **Frutas do Brasil, Maçã Pós-colheita**. Brasília:Embrapa, 2004. p.35-44

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

VARGAS, M. et al. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**. v. 41, p. 164-171, 2006.

VASYUKOVA, N.I. et al. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, p. 103-109, 2001.

VAUGHN, S.F.; SPENCER, G.F.; SHASHA, B.S. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. **Journal of Food Science**, 34, p. 793-796, 1993.

VINAS, I.; USALL, J.; SANCHIS, V. Tolerance of *Penicillium expansum* to post-harvest fungicide treatments in apple packing-houses in Lerida (Spain). **Mycopathologia**, v. 113, p. 15-18, 1991.

VINAS, I. et al. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 9-16, 1998.

WANG, L. et al. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, p. 244-251, 2006.

WANG, F.; FENG, G.; CHEN, K. Defense responses of harvested tomato fruit to burdock fructooligosaccharide, a novel potential elicitor. **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 110-116, 2009.

WHITNEY, K. W., ARNOTT, H. D. The effect of calcium on mycelial growth and calcium oxalate crystal formation in *Gilbertella persicaria* (Mucorales). **Mycologia**, v. 80, p. 707-715, 1988.

WILSON, D. M.; NUOVO, G. J. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. **Applied Microbiology**, v. 26, p. 124-125, 1973.

WILSON, C.L.; FRANKLIN, J.D.; OTTO, B.E. Fruit volatiles inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 71, p. 316-319, 1987.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 195-202, 1997.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 763-767, 1998.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003.

ZHONG, Q.P.; XIA, W.S. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatine blend plasticized with glycerol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 262-269, 2008.

ZIANI, K. et al. Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.8, p. 2309-2314, 2009.

ZUURMAN, K.; MAARSCHALK, K.V.D.V.; BOLHUIS, G.K. Effect of magnesium stearate on bonding and porosity expansion of tablets

produced from materials with different consolidation properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 107-115, 1999.

XU, Y. X. et al. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 185-192, 2005.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Curva padrão obtida a partir de Albumina de Soro Bovino e respectiva equação da reta, utilizados para o cálculo de proteínas totais através do método de Bradford.

